



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Abordagem molecular para o diagnóstico e análise da  
variabilidade genética de *Schistosoma haematobium* e de  
*Schistosoma mansoni* em Angola.**

**Ilda Rosalina Jeremias**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,  
ESPECIALIDADE DE PARASITOLOGIA MÉDICA**

ABRIL, 2018



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Abordagem molecular para o diagnóstico e análise da  
variabilidade genética de *Schistosoma haematobium* e de  
*Schistosoma mansoni* em Angola.**

**Autor:** Ilda Rosalina Jeremias

**Orientadora:** Professora Doutora Silvana Maria Duarte Belo

**Coorientadora:** Professora Doutora Maria Amélia Grácio

**Coorientadora:** Investigadora Doutora Ana Júlia Afonso

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Especialidade de Parasitologia Médica.

Apoio financeiro concedido pela Fundação Calouste Gulbenkian, no âmbito da “2ª Edição de bolsas de doutoramento na área das Doenças Tropicais Negligenciadas para licenciados dos PALOP”

# Dedicatória

Dedico este trabalho de tese à minha família,  
nomeadamente aos meus pais, que sempre  
me ensinaram que o conhecimento é uma  
herança que nunca nos será retirada,  
ao meu esposo Marcolino Victorino,  
aos meus filhos, Arildson Victorino, Airton Victorino,  
Edivaldo Victorino e Victória Victorino,  
Vocês são os vasos mais preciosos da minha vida.

# Agradecimentos

*O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.*

**“Fernando Pessoa”**

Este trabalho de tese foi desenvolvido na Unidade de Ensino e Investigação de Parasitologia Médica (UEIPM), Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT/UNL). Não teria sido possível realizá-lo sem o apoio e amizade de muitas pessoas. Na impossibilidade de mencionar todas elas, destaco algumas das mais marcantes. Deste modo, quero agradecer:

Em primeiro lugar a Deus, que me manteve equilibrada durante todos os momentos, que me deu capacidade de acreditar na minha paixão e prosseguir meus sonhos.

À minha orientadora, Professora Doutora Silvana Belo, Prof<sup>a</sup> Auxiliar do IHMT, pela orientação deste trabalho e pela oportunidade que me deu de poder trabalhar em investigação, pela dedicação, pela aposta que fez em mim, no acompanhamento sistemático da realização da tese, pelos seus conselhos, pelo seu espírito crítico sempre prontos ao longo deste percurso, os ensinamentos, a sua pronta disposição em apoiar-me e pelo envolvimento incondicional neste trabalho, pelo seu dom de compartilhar os seus conhecimentos, assim como toda a amizade demonstrada ao longo de todo este tempo que temos trabalhado juntas, a minha gratidão.

À minha coorientadora, Professora Doutora Maria Amélia Grácio, Professora Catedrática Jubilada do IHMT, pela coorientação e supervisão deste trabalho, por todo o apoio, pela dedicação no acompanhamento da tese, pelo carinho, pelos seus ensinamentos, pelos seus conselhos e apoio incondicional, pela sua sensibilidade, sua generosidade e incentivo

dado durante todo este tempo, muito obrigada.

À minha coorientadora, Investigadora Doutora Ana Júlia Afonso pela paciência, determinação, carinho, sabedoria e dedicação, pela sua pronta disponibilidade para tirar todas as dúvidas que me iam surgindo no decorrer dos trabalhos e sobretudo pela amizade e simplicidade o que tornou esta grande batalha possível de vencer, pelo seu envolvimento neste trabalho, compartilhando as descobertas e fracassos, a sua competência e generosidade despertam em mim admiração, muito obrigada.

À Professora Doutora Manuela Calado, pela paciência, ensinamentos que me transmitiu, durante todo este tempo, o apoio incondicional dado durante os trabalhos de laboratório sobretudo na biologia molecular e pronta disponibilidade em ensinar e apoiar, a minha gratidão.

À Doutora Patrícia Salgueiro, a minha gratidão pelos ensinamentos que me transmitiu durante os trabalhos de laboratório, nomeadamente a nível da biologia molecular.

À Professora Doutora Isabel Maurício, pelos ensinamentos e apoio incondicional dado durante os trabalhos de laboratório sobretudo na biologia molecular e pronta disponibilidade em ensinar, a minha gratidão.

Ao Doutor Pedro Ferreira, pelo apoio durante as práticas laboratoriais, pelos seus conselhos, a sua pronta disposição em ensinar-me neste trabalho, pela sua disponibilidade em compartilhar os seus conhecimentos, assim como toda a amizade demonstrada, durante todo este tempo, a minha gratidão.

Aos colegas Tiago Mendes e António Pinto, pelo apoio durante as práticas laboratoriais, pela amizade e consideração, o meu muito obrigado.

Às Técnicas Nelma Pontes, Alda Deolinda, Maria da Conceição Dias dos Santos e Dr. Joltim Quinvinja pelo apoio durante o trabalho laboratorial no Instituto Nacional de Saúde Pública (INSP), Luanda.

À Técnica Isabel Clemente, pela amizade e disponibilidade em apoiar-me na execução das técnicas parasitológicas, no IHMT.

A Doutora Constantina Furtado pela amizade e incentivo para a frequência desta formação e pelo apoio moral.

Ao Ministério da Saúde da República de Angola, em particular ao INSP, por me ter autorizado a realização deste projeto de doutoramento.

Às Forças Armadas Angolas pelo apoio financeiro, para conclusão deste projeto.

À equipa técnica da Direção Provincial da Saúde do Hospital Central de Malange e à organização não governamental CONSAUDE pelo apoio dado durante o trabalho de campo.

Às autoridades das aldeias de Malange, nomeadamente da população do Quela 1 e Quela 2, da Funda, no Município de Cacuaco em Luanda, que aceitaram participar no estudo com a sua excelente cooperação.

À Direção da Escola da Funda/Cacuaco por permitir trabalhar com os seus alunos.

Às Direções Provinciais de Saúde da Bengo e da Huíla, pelo apoio dado durante o trabalho de campo.

Ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa, Portugal, por todo o apoio concedido.

Ao Centro “The Schistosomiasis Resource Center for distribution by BEI Resources, NIAID, NIH” por me ter cedido amostra de DNA de *S. haematobium* para o controlo positivo.

# Resumo

As espécies *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mansoni* são os agentes causais das schistosomoses urogenital e intestinal, respetivamente, em Angola e responsáveis pela elevada morbilidade na população, com destaque para *S. haematobium*, espécie endémica em todo o país. O tratamento dos grupos populacionais de maior risco é uma das medidas prioritárias dos programas de controlo da doença, sendo fundamental a utilização de métodos de diagnóstico apropriados para identificação mais precisa das comunidades alvo de controlo terapêutico. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivos avaliar a aplicabilidade dos métodos moleculares baseados na *Polymerase Chain Reaction* (PCR) na deteção de *Schistosoma* spp em amostras biológicas (excreta) de indivíduos residentes nas províncias de Luanda, Bengo, Huíla e Malange, e a influência da infeção no perfil hematológico, bem como analisar a estrutura populacional dos parasitas destas regiões.

O estudo envolveu 366 indivíduos, 187 do género feminino e 179 do masculino, com idades compreendidas entre os 2 e 75 anos (média 18,5 anos  $\pm$  12,2 DP), sendo a maioria (67,7%) do grupo etário inferior aos 20 anos. Conjugando as técnicas parasitológicas (filtração da urina e Kato-Katz) com a PCR, as prevalências globais estimadas foram de 76,9% para *S. haematobium* e de 73,8% para *S. mansoni*. Com exceção da província do Bengo, onde não se detetou *S. mansoni*, as restantes são coendémicas para as duas espécies de *Schistosoma* e, atendendo à taxa de prevalência, poderão ser consideradas hiperendémicas para *S. haematobium*, situação idêntica para *S. mansoni* em Malange. Acresce que no controlo efetuado quatro meses após a terapêutica (Malange e Luanda) foi evidente a persistência da infeção schistosómica nos indivíduos previamente tratados. Apesar da maioria dos indivíduos analisados apresentar grau de infeção moderado, foi evidente a associação do parasitismo com os parâmetros hematológicos indicadores de anemia, em particular com os níveis de hemoglobina e hematócrito, significativamente inferiores (Mann-Whitney,  $P=0,048$ ) nos indivíduos parasitados e na ausência de coinfeção por outros parasitas.

O presente estudo realça a vantagem de utilização adicional da técnica da PCR, demonstrando maior sensibilidade que os métodos parasitológicos, possibilitando a deteção e diferenciação das duas espécies em situações de coinfeção e de baixa carga parasitária. Esta característica foi especialmente marcada no caso da infeção por *S. mansoni*, com o dobro de casos positivos detetados pela PCR em comparação com o método de Kato-Katz. Acresce que só com a inclusão da PCR foi possível detetar casos positivos por esta espécie na província da Huíla. A análise genética por RAPD-PCR das populações de *S. haematobium* de Luanda e Malange, demonstrou baixo coeficiente de similaridade (0,55 e 0,35) para dois *primers* A01 e A02, respetivamente, sugerindo a existência de variabilidade genética inter-regional. No entanto, o estudo mais específico da diferenciação genética entre os parasitas das duas regiões, utilizando um painel de 14 marcadores de microssatélites, revelou resultados pouco consistentes, apontando para a necessidade de estudos mais diferenciados, com vista a identificar a existência de sub-estrutura populacional destas espécies no país e a sua eventual relação com as diferenças regionais observadas a nível da patologia e da resposta à terapêutica.

**Palavras-Chave:** *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, diagnóstico molecular, variabilidade genética, Angola.

# Abstract

In Angola, *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*, the causative agents of urogenital and intestinal schistosomiasis, respectively, are responsible for high morbidity in the population, with emphasis for *S. haematobium*, due to its endemicity in the whole country. Treatment of the highest-risk population groups is one of the priority measures of the disease control programmes, and the use of appropriate diagnostic methods for the more accurate identification of the target communities required drug administration is essential. In this sense, the objective of this study was to evaluate the applicability of molecular methods based on the Polymerase Chain reaction (PCR) in the detection of *Schistosoma* spp. in biological samples (excreta) of individuals resident in the provinces of Luanda, Bengo, Huíla and Malange, and the influence of the infection in the hematological profile, as well as to analyse the genetic structure of the parasites of these regions.

The study involved 366 individuals, 187 females and 179 males, aged between two and seventy-five years (average 18.5 years  $\pm$  12.2 SD), most of which were (67.7%) of the age group under 20 years. Combining the parasitological techniques (urine filtration and Kato-Katz) with PCR, the estimated global prevalence was 76.9% for *S. haematobium* and 73.8% for *S. mansoni*. With the exception of the province of Bengo, where no *S. mansoni* has been found, the remaining are co-endemic for both *Schistosoma* species and, based on the prevalence rate, should be considered hyper-endemic to *S. haematobium*, as well as for *S. mansoni* in Malange. In addition, the control carried out four months after treatment (Malange and Luanda) was evident the maintenance of schistosome infection in previously treated individuals. Although most of the subjects analysed have moderate infection, there was a significant association of infection status with the main haematological parameters of anaemia, in particular with the levels of haemoglobin and haematocrit, significantly lower (Mann-Whitney,  $P=0.048$ ) in those infected even in the absence of coinfection by other parasites.

This study highlights the advantage of additional use of the PCR technique, showing greater sensitivity than the parasitological methods, enabling the detection and differentiation of the two species in coinfection and low parasitic load. This feature was especially marked in *S. mansoni* infection, with twice of positive cases detected by PCR as compared to the Kato-Katz method. In addition, only with the inclusion of PCR was possible to detect positive cases by this specie in the province of Huíla. The genetic analysis by RAPD-PCR comparing *S. haematobium* isolates from Luanda and Malange, demonstrated low coefficient of similarity (0.55 and 0.35) for two primers A01 and A02, respectively, suggesting the existence of interregional genetic variability. However, more specific genetic characterization of the parasites of the two regions, using a panel of 14 microsatellites markers, revealed little consistent results, pointing out to the need for more differentiated studies, in order to identify the existence of eventual differences among population's structure of these species in the country and their eventual relationship with the regional differences observed in pathology and response to therapy.

**Keywords:** *Schistosoma haematobium*, *Schistosma mansoni*, molecular diagnostis, genetic variability, Angola.



# Índice Geral

<b>Dedicatória</b> .....	II
<b>Agradecimentos</b> .....	III
<b>Resumo</b> .....	VI
<b>Abstract</b> .....	VII
<b>Índice Geral</b> .....	VIII
<b>Índice de Figuras</b> .....	XII
<b>Índice de Tabelas</b> .....	XIV
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	XV
<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. <i>Schistosoma</i> spp e schistosomose.....	2
1.1.1. Nota histórica .....	2
1.1.2. Dados históricos de schistosomose em Angola.....	4
1.1.3. Taxonomia e sistemática de <i>Schistosoma</i> spp.....	4
1.1.4. Morfologia e biologia de <i>Schistosoma</i> spp.....	5
1.1.5. Ciclo de vida .....	6
1.1.6. Patologia.....	10
1.1.7. Distribuição geográfica de <i>Schistosoma</i> spp.....	12
1.1.8. Schistosomose: Situação epidemiológica global.....	13
1.1.9. Situação epidemiológica da schistosomose em África .....	15
1.2. Epidemiologia da schistosomose em Angola.....	15
1.2.1. Bacia hidrográfica e a schistosomose.....	18
1.2.2. Breve caracterização geográfica e sociodemográfica de Angola.....	20
1.3. Diagnóstico da schistosomose .....	22
1.3.1. Métodos parasitológicos .....	22
1.3.2. Métodos imunológicos .....	23
1.3.3. Métodos moleculares.....	24
1.4. Controlo da schistosomose.....	27
1.5. Variabilidade genética de <i>Schistosoma</i> spp: implicações no controlo.....	29

<b>2. Objectivos .....</b>	<b>32</b>
<b>3. Material e Métodos .....</b>	<b>33</b>
3.1. Locais e população .....	34
3.1.1. Província de Luanda .....	35
3.1.2. Província do Bengo.....	36
3.1.3. Província de Malange .....	36
3.1.4. Província da Huíla .....	37
3.2. Sensibilização da população nas províncias em estudo.....	39
3.3. Colheita e preparação de amostras biológicas (urina, fezes e sangue) .....	39
3.4. Pesquisa de ovos de <i>Schistosoma haematobium</i> e detecção de hematúria.....	40
3.5. Colheita e processamento das amostras de fezes.....	41
3.6. Método molecular.....	43
3.6.1. Extração de DNA para detecção de <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> .....	43
3.6.2. Extração e precipitação de DNA de fezes e urina conservadas em Trizol (Invitrogen) .....	43
3.6.3. Extração de DNA de fezes e urina pelo método de CTAB (Tampão brometo de hexadeciltrimetilamónio), descrito por Stothard & Rollinson (1996), com ligeiras modificações .....	43
3.6.4. Quantificação e pureza de DNA.....	44
3.6.5. Análise molecular.....	44
3.6.6. Reação de PCR convencional.....	46
3.6.6.1. Detecção de DNA de <i>S. haematobium</i> pela PCR.....	46
3.6.6.2. Detecção de DNA de <i>S. mansoni</i> pela PCR.....	46
3.7. Análise por RAPD-PCR.....	47
3.7.1. Método de RAPD-PCR.....	47
3.7.1.1. Extração de DNA genómico .....	47
3.7.1.2. Amplificação de RAPD-PCR .....	48
3.7.1.3. Reação de RAPD-PCR .....	48
3.7.1.4. Gel de agarose a 2% .....	49
3.7.1.5. Análise dos perfis electroforéticos .....	49
3.7.1.6. Otimização de RAPD-PCR .....	49

3.8. Estudo populacional através da análise dos microssatélites.....	50
3.8.1. <i>Schistosoma haematobium</i> .....	51
3.8.1.1. Multiplex com 7 loci.....	52
3.8.1.2. Amplificação da PCR de <i>Schistosoma haematobium</i> .....	52
3.8.1.3. Perfil da PCR-multiplex de <i>Schistosoma haematobium</i> .....	53
3.8.2. <i>Schistosoma mansoni</i> .....	54
3.8.2.1. Amplificação da reação de <i>S. mansoni</i> .....	55
3.8.2.2. Multiplex com 7 loci.....	55
3.8.2.3. Condições da reação do ciclo de <i>S. mansoni</i> .....	56
3.8.3. Análise dos fragmentos e genotipagem.....	58
3.9. Análise Estatística .....	58
3.10. Considerações Éticas.....	59
<b>4. Resultados</b> .....	61
4.1. Caracterização e distribuição da população analisada.....	61
4.1.1. Perfil sociodemográfico dos participantes do estudo.....	61
4.2. Resultados da análise parasitológica (urina e fezes).....	63
4.2.1. Prevalência de <i>Schistosoma haematobium</i> e <i>Schistosoma mansoni</i> .....	64
4.2.2. Prevalência da infecção schistosómica em relação ao género .....	64
4.2.3. Prevalência e intensidade do parasitismo em relação à idade.....	65
4.3. Resultados da análise molecular.....	66
4.3.1. Detecção de DNA de <i>S. haematobium</i> na urina e de <i>S. mansoni</i> nas fezes .....	66
4.3.2. Coinfecção de <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> pelos métodos parasitológicos e pela PCR.....	68
4.3.3. Especificidade da técnica de PCR na coinfecção com outros helmintas.....	69
4.3.4. Estimativas da prevalência de <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> com as técnicas parasitológicas e a PCR.....	70
4.3.5. Controlo Pós terapêutico em Malange e Luanda.....	71
4.4 Análise hematológica e o estado parasitológico.....	72
4.5. Características sociodemográficas associadas à infecção por <i>Schistosoma</i> spp.....	74
4.6. Análise da variabilidade genética de isolados de <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> .....	76

4.6.1. Análise genética por RAPD-PCR.....	76
4.6.1.1. Análise dos fragmentos obtidos.....	76
4.6.1.2. Coeficiente de similaridade.....	78
4.6.1.3. Análise da diversidade genética.....	79
4.6.2. Análise genética por microssatélites.....	79
<b>5. Discussão .....</b>	<b>81</b>
<b>6. Conclusões e Recomendações .....</b>	<b>93</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>97</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>131</b>
Anexo 1. Procedimentos Éticos .....	132
Anexo 1.1. Pedido de autorização ao Comité de Ética de Angola (3ª via).....	132
Anexo 1.2. Pedido de Consentimento Informado aos participantes.....	133
Anexo 1.3. Parecer do Comité de Ética de Angola.....	134
Anexo 2. Técnicas parasitológicas.....	136
Anexo 2.1. Técnica de Kato-Katz.....	136
Anexo 2.2. Técnica de Telemann-Lima.....	139
Anexo 2.3. Técnica de filtração da urina.....	140
Anexo 2.4. Ficha de inquérito.....	141
Anexo 3. Técnicas moleculares.....	143
Anexo 3.1. Extração de DNA de fezes e urina pelo método de CTAB (Tampão brometo de hexadeciltrimetilamônio), descrito por Stothard & Rollinson (1996), com ligeiras modificações.....	146
Anexo 3.2. Extração de DNA de fezes e urina pelo método de Trizol com ligeiras modificações .....	148

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática de vermes adultos de <i>Schistosoma</i> spp.....	5
<b>Figura 2:</b> Morfologia dos ovos de <i>Schistosoma</i> spp .....	6
<b>Figura 3:</b> Ciclo biológico de <i>Schistosoma</i> spp.....	7
<b>Figura 4:</b> <i>Schistosoma</i> spp, respectivos hospedeiros intermediários e distribuição .....	8
<b>Figura 5:</b> Distribuição geográfica das espécies de <i>Schistosoma</i> spp .....	12
<b>Figura 6:</b> Classificação da prevalência da schistosomose .....	14
<b>Figura 7:</b> Distribuição e prevalência da schistosomose por <i>S. haematobium</i> .....	16
<b>Figura 8:</b> Prevalência da hematúria em Angola.....	17
<b>Figura 9:</b> Distribuição de <i>Schistosoma mansoni</i> em Angola.....	17
<b>Figura 10:</b> Bacia hidrográfica de Angola.....	19
<b>Figura 11:</b> Atividades diárias da população no rio Bengo.....	19
<b>Figura 12:</b> Províncias angolanas onde decorreu o estudo.....	34
<b>Figura 13:</b> Escola do ensino primário da Funda/ Cacuaco .....	36
<b>Figura 14:</b> Fonte de infeção de schistosomose Quela/Malange.....	37
<b>Figura 15:</b> Curso de água permanente, Município da Humpata/Huíla .....	38
<b>Figura 16:</b> Centro Médico do Município da Humpata/Huíla.....	39
<b>Figura 17:</b> Kit para filtração de urina para pesquisa de <i>S. haematobium</i> .....	41
<b>Figura 18:</b> Fitas reativas para a deteção de hematuria (Test UX®) .....	41
<b>Figura 19:</b> Método de Kato-Katz .....	42
<b>Figura 20:</b> Método de Telemann-Lima .....	42
<b>Figura 21:</b> Gel de electroforese a 2% de otimização da PCR, para deteção de DNA <i>S. haematobium</i> na faixa dos 121 pb em 12 amostras.....	46
<b>Figura 22:</b> Imagem ilustrativa do gel de electroforese a 2% da optimização do RAPD-PCR, para amplificação de DNA dos ovos de <i>S. haematobium</i> .....	50
<b>Figura 23:</b> Imagem representativa do gel de electroforese 2% para optimização da técnica dos microssatélites.....	57
<b>Figura 24:</b> Prevalência de <i>S. haematobium</i> em 366 amostras de urina .....	63
<b>Figura 25:</b> Prevalência de <i>S. mansoni</i> em 145 amostras de fezes.....	63
<b>Figura 26:</b> Prevalência de <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> nas províncias de Malange, Luanda, Huíla e Bengo .....	64

<b>Figura 27:</b> Prevalência de <i>S. haematobium</i> e de <i>S. mansoni</i> em relação ao género.....	65
<b>Figura 28:</b> Prevalência de <i>S. haematobium</i> em relação ao grupo etário .....	65
<b>Figura 29:</b> Prevalência de <i>S. mansoni</i> em relação ao grupo etário.....	66
<b>Figura 30:</b> Detecção de DNA de <i>S. haematobium</i> na faixa dos 121 pares de bases.....	67
<b>Figura 31:</b> Detecção de DNA de <i>S. mansoni</i> nas fezes por PCR convencional.....	68
<b>Figura 32:</b> Análise por PCR convencional na detecção de DNA de infecções mistas por <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> .....	69
<b>Figura 33:</b> Número de casos em coinfeção com outras helmintoses.....	69
<b>Figura 34:</b> Prevalência estimada das infeções por <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> com os métodos parasitológico e molecular .....	71
<b>Figura 35:</b> Comparação dos níveis de hemoglobina e hematócrito de acordo com o parasitismo por <i>S. haematobium</i> .....	72
<b>Figura 36:</b> Correlação dos níveis de hemoglobina (HGB) e do hematócrito (HCT) com a carga parasitária de <i>S. mansoni</i> .....	73
<b>Figura 37:</b> Infecção por geohelminthas.....	74
<b>Figura 38:</b> Gel de agarose a 1,5% usando o <i>primer A01</i> e marcador de 2000 pb para as amostras de <i>S. haematobium</i> da província de Malange.....	77
<b>Figura 39:</b> Gel de agarose a 1,5% usando o <i>primer A02</i> e marcador de 2000 pb para as amostras de <i>S. haematobium</i> da província de Malange.....	77
<b>Figura 40:</b> Gel de agarose a 1,5% usando o <i>primer A01</i> e marcador de 2000 pb para as amostras de <i>S. haematobium</i> da província de Luanda.....	77
<b>Figura 41:</b> Gel de agarose a 1,5% usando o <i>primer A02</i> e marcador de 2000 pb para as amostras de <i>S. haematobium</i> da província de Luanda.....	78
<b>Figura 42:</b> Diversidade genética entre as populações de <i>S. haematobium</i> de Malange e Luanda aplicando o programa PHYLIP e o método da <i>Maximum Parsimony</i> .....	79

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> <i>Primers</i> específicos utilizados na PCR convencional para detecção de <i>S. haematobium</i> e respetivas sequências .....	45
<b>Tabela 2:</b> Marcadores RAPD utilizados e respetivas sequências nucleotídicas .....	48
<b>Tabela 3:</b> Microsatélites: <i>primers</i> de <i>S. haematobium</i> sequências e marcadores ....	51
<b>Tabela 4:</b> Preparação de 10X <i>Primer Mix</i> (contendo 2 µm de cada <i>primer</i> ) .....	52
<b>Tabela 5:</b> Mix do multiplex - PCR.....	52
<b>Tabela 6abc:</b> Condições de amplificação de ciclos de <i>S. haematobium</i> .....	53
<b>Tabela 7:</b> Microsatélites: <i>primers</i> de <i>S. mansoni</i> respetivas sequências e marcadores.....	54
<b>Tabela 8:</b> Mix do Multiplex - PCR para <i>S. mansoni</i> .....	55
<b>Tabela 9:</b> Preparação de 10X <i>primers mix</i> .....	55
<b>Tabela 10 abc:</b> Condições de amplificação do ciclo de <i>S. mansoni</i> .....	56
<b>Tabela 11:</b> Perfil sociodemográfico da população analisada.....	62
<b>Tabela 12:</b> Comparação da sensibilidade analítica das técnicas de PCR com a filtração e o teste de hematúria no diagnóstico de <i>S. haematobium</i> na urina.....	67
<b>Tabela 13:</b> Comparação da sensibilidade analítica das técnicas de Kato-Katz e da PCR no diagnóstico de <i>S. mansoni</i> nas fezes.....	68
<b>Tabela 14:</b> Estimativas da prevalência de <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> .....	70
<b>Tabela 15:</b> Controlo pós tratamento em Malange e Luanda.....	71
<b>Tabela 16:</b> Condições sociodemográficas associadas ao estado parasitológico.....	75
<b>Tabela 17:</b> Número de bandas polimórficas encontradas para as amostras de <i>S. haematobium</i> e <i>S. mansoni</i> aplicando os <i>primers</i> A01 e A02.....	76
<b>Tabela 18:</b> Coeficiente de similaridade de Dice (S) entre as províncias de Luanda e Malange para <i>S. haematobium</i> .....	78
<b>Tabela 19:</b> Cálculo de número de ovos por gramas de fezes.....	138

# Lista de abreviaturas

- 16S rRNA:** região 16 da pequena subunidade ribossomal
- CAA:** Antígeno Circulante Anódico - *Circulating anodic antigen*
- CCA:** Antígeno Circulante Catódico - *Circulating cathodic antigen*
- cDNA:** ADN complementar - *Complementary DNA*
- CI:** Incompatibilidade citoplasmática - *Cytoplasmatic incompatibility*
- Ct:** Ciclo máximo do *threshold* na reação de PCR em tempo real
- CTAB:** *Cetyltrimethylammonium Bromide*
- DALYs:** *Disability Adjusted Life Years*
- d’NTP:** Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico - *Deoxyribonucleic acid*
- DO:** Densidade Óptica
- EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA:** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- FNUAP:** Fundo das Nações Unidas para a População- *United Nations Population Fund*
- HCT:** Hematócrito
- HDR:** *Human Development Report*
- HGB:** Hemoglobina
- HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana - *Human Immunodeficiency Virus*
- HMM:** Helminologia e Malacologia Médicas
- H<sub>2</sub>O dd:** Água destilada desionizada
- IHMT:** Instituto de Higiene e Medicina Tropical
- INSP:** Instituto Nacional de Saúde Pública
- ITS:** Transcrição da Região Interna- *Internal Transcribed Spacer*
- IgG:** Imunoglobulina G
- IL:** Interleucina
- INF-  $\gamma$ :** Interferão gama
- ITS2:** *Internal transcribed spacer 2*
- L1-5:** Larva de primeiro ao quinto estágio



**LAMP:** *Loop-Mediated Isothermal Amplification*

**mg:** Miligrama

**MgCl<sub>2</sub>:** Cloreto de Magnésio

**mM:** micromolar

**MINPLAN:** Ministério do Planeamento e do Desenvolvimento Territorial

**MINSa:** Ministério da Saúde de Angola

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensageiro

**mtDNA:** DNA mitocondrial

**Ng:** Nanograma

**NTD:** Doenças Tropicais Negligenciadas - *Neglected Tropical Diseases*

**NTR:** *Number of Tandem Repeats*

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**OPG:** Número de ovos por grama de fezes

**pH:** Potencial de Hidrogénio

**Pb:** Pares de bases

**PBS:** Tampão fosfato salino - *Phosphate Buffered Saline*

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase - *Polymerase chain reaction*

**PIB:** Produto Interno Bruto

**PNCS:** Programa Nacional de Controlo da Schistosomose

**PNUD:** Programa das Nações Unidas Para o Desenvolvimento

**PZQ:** Praziquantel

**RAPD:** Amplificação Arbitrária de ADN Polimórfico- *Random Amplified Polymorphism*

**RFLP:** Polimorfismo de comprimento do fragmento de restrição- *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**RNA:** Ácido Ribonucleico- *Ribonucleic Acid*

**SADC:** *Southern African Development Community*

**SI:** Sistema imunitário

**SIDA:** Síndrome de Imuno Deficiência Adquirida

**SSR:** Repetição de Frequências Simples- *Simple Sequence Repeats*

**SNPs:** Polimorfismos Nucleotídicos Únicos Simples- *Single Nucleotide Polymorphisms*

**T.A.:** Temperatura ambiente

**TAE:** Tris-Acetato-EDTA

**TE:** Tris-EDTA

**Th1:** Resposta imunitária de tipo 1

**Th2:** Resposta imunitária de tipo 2

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrose tumoral alfa

**UNICEF:** Fundo das Nações Unidas para a Infância - *United Nations Children`s Fund*

**UV:** Ultravioleta

**VNTRs:** Número Variável de Repetições Sequenciais em Tandem- *Variable Number of Tandem Repeats*

**WGA:** *Whole Genome Amplification*

**WGS:** *Whole Genome Shotgun*

**WHO:** *World Health Organization*

**$\mu$ l:** Microlitro

# **1. Introdução**

## 1. Introdução geral

### 1.1 – *Schistosoma* spp e schistosomose

Os tremátodes do género *Schistosoma* são os agentes causais da schistosomose (ou bilharziose), parasitose aguda e crónica, que afeta aproximadamente 240 milhões de pessoas em todo o mundo, das quais cerca de 93% na África subsariana. A schistosomose é responsável, anualmente, por 70 milhões de anos de vida de incapacidade perdidos (DALYs) só no continente africano (King & Bertino, 2008; Hotez & Fenwick, 2009).

É uma parasitose endémica em 78 países das regiões tropical e subtropical, especialmente nas áreas rurais de países de baixa renda, estimando-se que mais de 700 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a infeção, por contacto com coleções de água doce, em atividades profissionais, domésticas ou de lazer. A schistosomose está no topo das designadas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) e é considerada a segunda doença parasitária, imediatamente após a malária, de maior importância em termos de morbilidade e mortalidade em África, Ásia e América Latina (WHO, 2013a; 2014).

A dinâmica de transmissão de *Schistosoma* spp é complexa, estando dependente de uma variedade de factores intrínsecos relacionados com as espécies parasitárias (capacidade infetante, imunogenicidade e patogenicidade), assim como, de fatores dependentes dos hospedeiros intermediários e definitivos, condições ecológicas e sociais. Admite-se que variações genotípicas intra-populacionais nas espécies de *Schistosoma* que parasitam o ser humano possam ser responsáveis por diferenças na gravidade clínica, magnitude da prevalência e resposta ao tratamento, observadas na mesma região ou em diferentes regiões geográficas (Gentile & Oliveira, 2008; Steinauer *et al.*, 2008).

Das principais espécies patogénicas para os humanos, destacam-se *S. haematobium*, responsável pela schistosomose urogenital, sendo as restantes, *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*, os agentes etiológicos da forma intestinal da doença. Tanto *S. haematobium* como *S. mansoni* são endémicas em Angola, sendo uma das principais causas de morbilidade no país.

### 1.1.1 – Nota histórica

Deve-se a Theodore Bilharz, patologista alemão, a identificação de *Schistosoma haematobium* em exames *pos-mortem* realizados em soldados egípcios em 1851, no Cairo, mas incluído no género *Distomium*. Weinland, em 1858, substituiu este nome por *Schistosoma*. No entanto, as referências às manifestações clínicas da schistosomose urogenital, como a hematúria crónica, descritas nos antigos papiros de Ebers, Hearts e Kahum, cerca de 1900 anos a. C., sugerem que a doença já era conhecida no Egipto e Mesopotâmia. Os resultados de investigações paleoepidemiológicas e paleogeográficas, demonstraram a presença de ovos calcificados de *Schistosoma haematobium* nos rins (Ruffler, 1910) e de antigénios circulantes (Colley, 1996) em múmias da 20<sup>a</sup> dinastia da era dos Faraós (1000-1250 a. C.), comprovando assim, a sua existência na antiguidade. Posteriormente, Harley (1864) e Cobbold (1864) sugeriram que a infeção humana ocorria por via cutânea.

A presença de ovos de esporão lateral, identificados por Manson em 1902 no exame coprológico de um doente em Londres, demonstrou a existência de uma segunda espécie do parasita, para a qual foi proposta a designação de *Schistosoma mansoni*. O papel de um molusco de água doce como hospedeiro intermediário, no ciclo biológico do parasita, foi descoberto por Leiper, em 1815 (citado por Barakat, 2013).

Apesar da espécie *Schistosoma japonicum* ter sido identificada só em 1904, por Katsurada, as manifestações clínicas associadas à doença, como a síndrome de Katayama, tinham sido descritas em 1847, na região de Hiroshima, Japão, o que comprova a antiguidade do conhecimento remoto da parasitose (Mao & Shao, 1982). Na sequência de estudos experimentais, Fujinamie e Nakamura (1909), citado por Tanaka e Tsuji (1997), demonstraram a via de transmissão e a presença de vermes adultos no sistema porta e, em 1924, foi identificado, na China, o respetivo hospedeiro intermediário, moluscos anfíbios do género *Oncomelania* (Cook & Zumla, 2009). No período mais recente, foram identificadas mais duas espécies, *Schistosoma intercalatum*, no Zaire (Fisher, 1934), *Schistosoma mekongi* (Voge, Bruckner & Bruce, 1978), numa área do delta do Mekong confinada ao Laos e Camboja, e *Schistosoma malayensis*, descoberta numa área limitada da Malásia em 1988, como potencialmente infetante para os humanos (Blair *et al*, 1997).

### 1.1.2 – Dados históricos de *Schistosoma* spp em Angola

As primeiras referências da infecção humana por *S. haematobium* em Angola datam de 1896 e foram feitas por Aires Kopke e Bernardino Roque em relação à região norte do país. Em 1902 foram identificados, por Bernardino Roque, os primeiros casos de infecção nas províncias de Cabinda, Ambriz e Huíla. No entanto, a parasitose só começou a ser divulgada nos boletins sanitários entre 1938 a 1955 (Leitão, 1989), apesar das medidas de controlo terem sido iniciadas em 1923 (Carvalho *et al*, 1966; Grácio, 1977/78a). A ocorrência de *S. mansoni* foi registada, pela primeira vez, na província de Benguela, em 1955 assim como a identificação dos respetivos moluscos hospedeiros intermediários: *Bulinus africanus*, para *S. haematobium* e *Biomphalaria pfeifferi* para *S. mansoni* (Leitão, 1989)

### 1.1.3 - Taxonomia e Sistemática de *Schistosoma* spp

Os parasitas do género *Schistosoma* integram um grupo zoológico de espécies inteiramente adaptadas ao parasitismo intravascular. São trematódes digenéticos, dióicos (sexos separados) pertencentes à Família Schistosomatidae e ao género *Schistosoma* que inclui as cinco principais espécies responsáveis pela doença nos humanos (Cook & Zumla, 2009).

Reino: ANIMALIA

Filo: PLATHYHELMINTHES

Superclasse: EUPLATHYHELMINTHES

Classe: TREMATODA

Subclasse: DIGENEA

Ordem: STRYGEIFORMES

Família: Schistosomatidae

Subfamília: Schistosomatinae

Género: *Schistosoma*

Espécie: *Schistosoma haematobium* – (Bilharz, 1851)

*Schistosoma mansoni* - (Manson, 1902)

*Schistosoma japonicum* – (Katsurada, 1904)

*Schistosoma intercalatum* - (Fisher, 1934)

*Schistosoma mekongi* – (Voge, Bruckner & Bruce, 1978)

### 1.1.4 - Morfologia e biologia de *Schistosoma* spp

As espécies de *Schistosoma* são parasitas com acentuado dimorfismo sexual na fase adulta, apresentam alternância de gerações entre o hospedeiro definitivo vertebrado e o hospedeiro intermediário, moluscos gastrópodes aquáticos ou anfíbios, específicos das espécies parasitárias. As fêmeas medem entre 10 a 30 mm de comprimento e 0,2 mm de largura, têm o corpo alongado e filiforme, apresentam o ovário oblongo, ligeiramente lobado e único, situado no terço médio do corpo (Figura 1). Os machos são mais curtos e robustos do que as fêmeas da mesma espécie, apresentam o corpo esbranquiçado e medem cerca de 10 a 20 mm de comprimento e 0,3 a 1 mm de largura com 4 ou 5 testículos, dependendo da espécie, situados junto à ventosa ventral (Rey, 2001). Apresentam um sulco ventral que se alonga até à extremidade posterior, formando o canal ginecóforo onde a fêmea é mantida após o acasalamento. Esta só é capaz de completar a sua maturação mediante o acasalamento com o macho (Gryseels, 2012), o qual possui um mecanismo pouco conhecido que regula a expressão de genes na fêmea e estimulação de factores necessários para o seu crescimento e desenvolvimento, bem como para o processo de fertilização dos ovos (Grevelding *et al*, 1997; Kunz, 2001). O acasalamento dos vermes ocorre nos capilares hepáticos pré-sinusoidais do hospedeiro vertebrado (Rey, 2001).

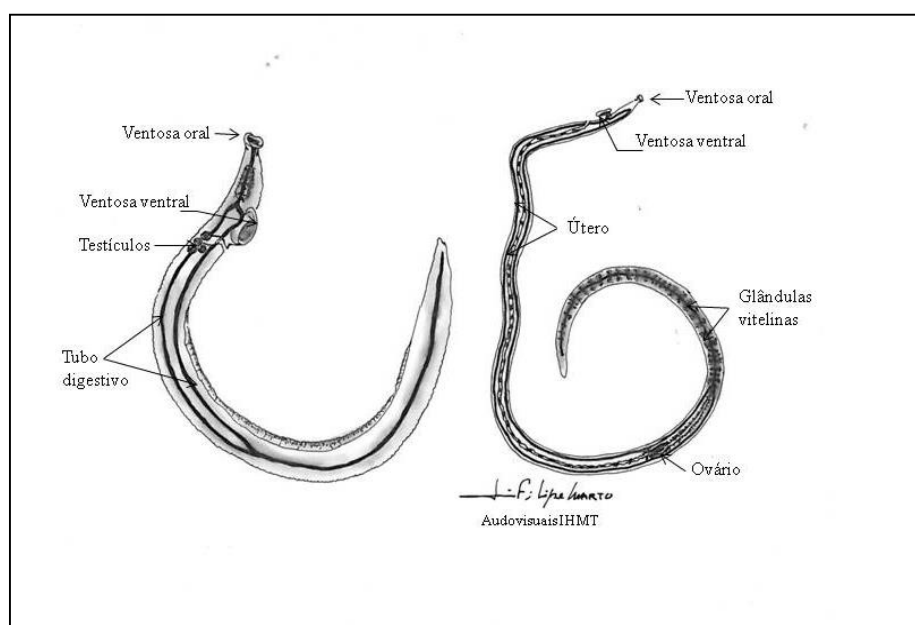


Figura 1- Representação esquemática de vermes adultos de *Schistosoma*

Os ovos diferem na sua morfologia, arredondados ou com forma elíptica e possuem um esporão terminal ou lateral característico da espécie (Figura 2), elemento necessário à sua penetração na parede dos vasos sanguíneos para serem eliminados com os excreta (urina ou fezes, dependendo da espécie).





Espécie de <i>Schistosoma</i>	<i>S. haematobium</i>	<i>S. mansoni</i>	<i>S. intercalatum</i>	<i>S. japonicum</i>
Morfologia				
Dimensões	115-175µm x 45-75µm	115-175µm x 45-70µm	140-240µm x 50-85µm	75-95 µm x 45-65µm
Via de eliminação	Urina	Fezes	Fezes	Fezes

Figura 2- Morfologia dos ovos de *Schistosoma* (Original do IHMT)

### 1.1.5 - Ciclo de vida

O género *Schistosoma* apresenta uma biologia diferente dos outros Plathelminths, relativamente ao modo de infeção do hospedeiro definitivo que consiste na penetração das cercárias de cauda bifurcada (furcocercárias) através da pele, quando os indivíduos entram em contacto com coleções de água doce onde existem estas formas larvares do parasita libertadas pelos moluscos gastrópodes, hospedeiros intermediários específicos do parasita. A transmissão dos schistosomas (Figura 3) ocorre quando o hospedeiro definitivo infectado elimina ovos viáveis e embrionados de *Schistosoma* na urina (*S. haematobium*) ou nas fezes (*S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* e *S. mekongi*) que entram em contato com coleções de água doce (rios, lagos, lagoas, etc).



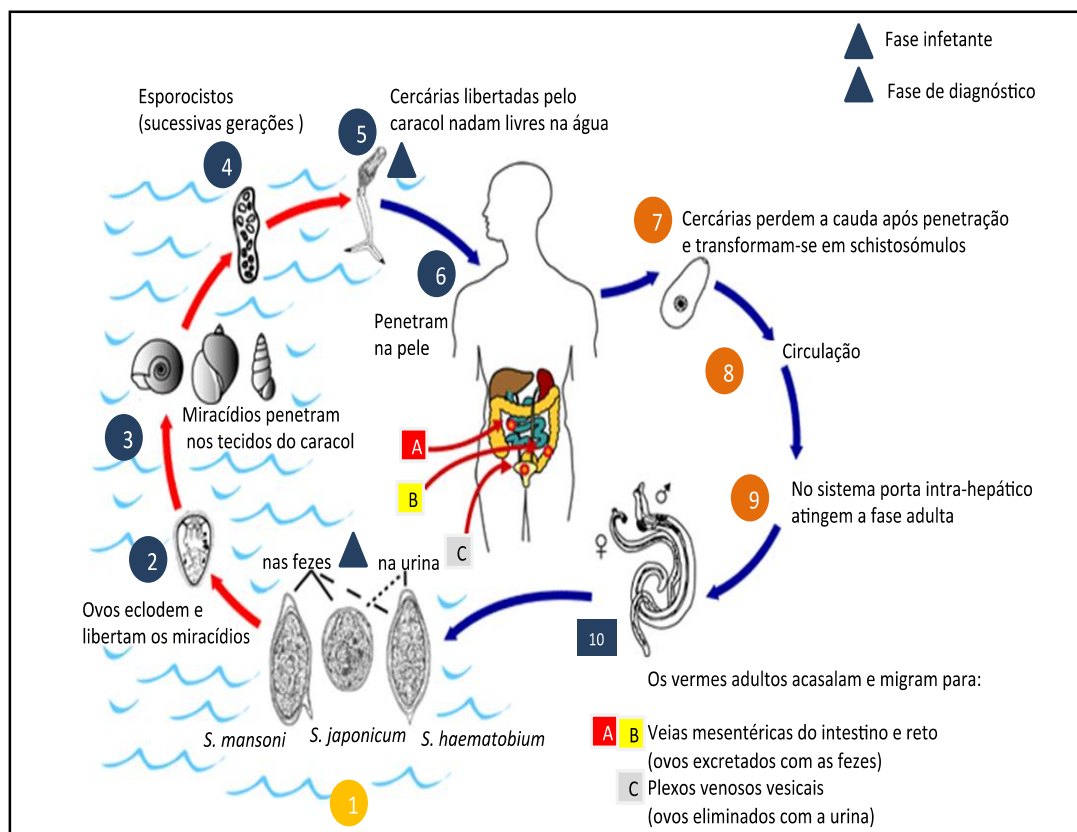


Figura 3 - Ciclo de vida de *Schistosoma* spp. (Autorizada adaptação de CDC-DPDx)

Neste ambiente, com temperatura de 25° a 30 °C, luminosidade e pressão osmótica adequadas, os ovos eclodem libertando uma forma larvar ciliada, denominada miracídio; esta movimenta-se até encontrar o molusco hospedeiro intermediário específico (Figura 4), penetrando nas zonas expostas nomeadamente pé, tentáculos e colar do manto.

Para *S. haematobium* e *S. intercalatum*, são moluscos do género *Bulinus* enquanto para *S. mansoni* pertencem ao género *Biomphalaria*. Moluscos anfíbios dos géneros *Oncomelania* e *Tricula* atuam como hospedeiros intermediários de *S. japonicum* e *S. mekongi*, respetivamente.

Espécies de <i>Schistosoma</i>	Molusco	Hospedeiro Intermediário	Distribuição
<i>S. haematobium</i>		<i>Bulinus africanus</i> <i>B. forskalli</i>  <i>B. truncatus/tropicus</i> <i>complex</i> <i>B. reticulatus</i>	África Subsariana África e Arábia e Ilhas do Oceano Índico África e Médio Oriente África, Península Arábica e Índia
<i>S. mansoni</i>		<i>Biomphalaria pfeifferi</i> <i>B. alexandrina</i> <i>B. glabrata</i> <i>B. tenogophila</i>	África Subsariana África: Sudão e Egipto Nordeste da América do Sul Península Arábica Antilhas e Madagáscar
<i>S. intercalatum</i>		<i>Bulinus africanus</i> <i>B. forskalli</i>	Nordeste RDC Camarões Gabão
<i>S. japonicum</i>		<i>Oncomelania h. hupensis</i> <i>O. h. quadrasi</i> <i>O. h. nosophora</i> <i>O. h. lindoensis</i> <i>O. h. formosana</i>	China Filipinas Japão Indonésia Taiwan
<i>S. mekongi</i>		<i>Neotricula aperta</i>	Camboja Laos Tailândia Malásia .

Figura 4 – *Schistosoma* spp, respetivos hospedeiros intermediários e distribuição

No caracol, os miracídios passam por modificações morfológicas, com um período de viabilidade infetante de 8 a 12 horas, originando esporocistos de 1ª geração, cerca de 24 horas após a penetração. Nesta forma, as células germinativas proliferam, crescem e multiplicam-se dando origem a esporocistos de 2ª geração que migram para os órgãos digestivo e sexual do molusco, onde se desenvolvem e sofrem rápidas divisões, dando origem a milhares de cercárias do mesmo sexo, forma larvar infetante para o hospedeiro definitivo. Estas são eliminadas do molusco cerca de 34 dias após penetração do miracídio e, segundo Rey (2001), este ciclo intra-molusco pode manter-se durante o período de sobrevivência do molusco, superior a oito meses, consoante a espécie.

O número de cercárias eliminadas pelo molusco, por dia, varia de acordo o tamanho e idade do molusco e oscila de 500 a 2000 cercárias. Essa eliminação depende dos hábitos de contacto do hospedeiro definitivo com a água, sendo a capacidade infectante das cercárias máxima nas primeiras oito horas, diminuindo até perder a sua atividade em 72 horas (Rey, 2001). Ao encontrar o mamífero suscetível (humanos, alguns primatas e roedores), penetram ativamente na pele ou mucosas. Ao penetrar no hospedeiro definitivo, as cercárias perdem a cauda e atravessam a epiderme até a lâmina basal num período de 15 a 30 minutos e transformam-se em schistosómulos. Este processo ocorre devido a contrações musculares e de enzimas líticas, segregadas pelas suas glândulas. Esta forma do parasita é mais vulnerável aos anticorpos do hospedeiro vertebrado nas primeiras três horas, podendo mesmo resultar na sua destruição.

Os schistosómulos invadem, preferencialmente, os vasos venosos da derme e são transportados passivamente para o coração e bombeados para os pulmões através das artérias pulmonares, cerca de sete dias após a penetração; através das veias pulmonares deixam o pulmão, passam para o coração esquerdo, seguem a circulação sistémica até alcançarem o sistema porta-hepático, onde se desenvolvem e atingem a maturidade sexual num período de 21 dias, podendo ao 14º dia já se distinguirem as fêmeas dos machos. O acasalamento ocorre entre o 29º e o 31º dia e o par de vermes migra, contra a corrente sanguínea, para o local onde ocorrerá a oviposição, nomeadamente para as veias do plexo vesical que drenam o sistema urinário no caso de *S. haematobium* e para as veias mesentéricas do intestino no caso de *S. mansoni*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*. No

endotélio vascular, as fêmeas depositam entre 50 a 500 ovos na mucosa vesical ou na luz intestinal, consoante a espécie de *Schistosoma*, que são eliminados, em parte, com a urina ou fezes, recomeçando o ciclo (Pellegrino & Coelho, 1978; Valadares *et al*, 1981; Lenzi *et al*, 2008).

Cerca de dois terços dos ovos produzidos diariamente pelas fêmeas ficam retidos na mucosa vesical ou intestinal, desencadeando uma reação inflamatória com formação de granulomas peri-ovulares, responsáveis pela patogenia da doença. Acidentalmente os ovos podem alojar-se noutros órgãos e tecidos, dando origem às formas ectópicas da schistosomose (Ferrari *et al*, 2004; Araújo *et al*, 2006; Koukounari *et al*, 2009; Ibrinke *et al*, 2011; Figueiredo *et al*, 2014; Lodh *et al*, 2014).

### 1.1.6 - Patologia

No caso de indivíduos infetados residentes em áreas endémicas, as manifestações agudas da doença passam quase sempre despercebidas. O período pré-patente varia de 1 a 2 meses e compreende desde a penetração das cercárias até ao aparecimento dos primeiros sintomas. Neste período, há relatos ocasionais de alguns sintomas como astenia, cefaleia, anorexia, mal-estar e náuseas. O início dos sintomas da fase aguda coincide com a eliminação e deposição dos primeiros ovos nos tecidos e pode caracterizar-se por um quadro febril denominado síndrome de Katayama. A fase crónica pode manifestar-se ao fim de vários meses ou anos, resultante da oviposição intensa e prolongada, com consequente resposta imunológica aos antígenos solúveis libertados pelos ovos, levando à formação de granulomas.

Na infeção crónica por *S. haematobium*, as manifestações caracterizam-se inicialmente por hematúria, disúria e polaquiúria, mais frequentes em crianças. A retenção dos ovos nas vénulas urogenitais e pélvicas, originam granulomas na bexiga e/ou nos órgãos genitais, provocam lesões locais com hiperemia e desenvolvimento de granulomas que evoluem para fibrose, resultando em cistites crónicas. Há hipertrofia muscular que evolui para lesões polipoides levando à formação de papilomas, ulcerações e fibrose (Abdel-Hadi & Talaat, 2000). Pode ocorrer calcificação do plexo urinário e da uretra, provocando lesões extensas, incluindo ureterohidronefrose, conduzindo a insuficiência renal. Devido à passagem direta dos ovos das veias urogenitais para as veias

sistêmicas e destas para a circulação pulmonar, pode conduzir a *cor pulmonale*. Também tem sido observada uma maior incidência de carcinoma de células escamosas da bexiga nas infecções por esta espécie (Gryschek & Chieffi, 2008; Rambau *et al*, 2013). Além destas manifestações patológicas, as lesões causadas pelo parasita na mucosa genital podem potenciar a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), especialmente em mulheres, (Leutsher *et al*, 2008; OMS, 2009). Outros efeitos resultantes da infecção incluem disfunção sexual e infertilidade, devido à ulceração e outras e outras lesões genitais, que, conseqüentemente, conduzem a diminuição da função reprodutiva (Richter, 2000; King & Dangerfield-Cha, 2008; Leutsher *et al*, 2009).

Nas espécies de *Schistosoma* responsáveis pela forma intestinal, a patologia pode ser causada pela inflamação precoce ou pela fibrose resultante dos granulomas formados no espaço periportal pré-sinusoidal, podendo causar hepatoesplenomegália, sobretudo nos grupos etários mais jovens (Booth *et al* 2004; Gryeels & Striland, 2013). Na fase hepatointestinal, as manifestações mais frequentes caracterizam-se por presença de diarreia e epigastralgia. As complicações induzidas pela cronicidade da infecção resultam da deposição massiva difusa de colagénio no espaço periportal podendo levar à fibrose de Symmer`s, com oclusão progressiva da veia porta, hipertensão portal, esplenomegália, circulação venosa colateral, ascite e varizes esofágicas (Dunne & Pearce 1999; Wilson *et al*, 2011; Elbaz & Esmat, 2013).

Para além da patologia direta nos órgãos, a infecção por schistossomas tem efeitos nocivos colaterais, incluindo a nível nutricional, das reservas orgânicas, especialmente ferro, desenvolvimento estado-ponderal e cognitivo, sobretudo em crianças (Hotez & Molyneux, 2008; WHO, 2012; Adenowo *et al*., 2015).

### **Interação parasita hospedeiro**

Devido ao carácter crónico que a schistosomose apresenta e a sua forma de transmissão, com cargas parasitárias relativamente pequenas, a infecção pode manter-se durante longos anos, sugerindo a existência de longo período de coevolução do hospedeiro e do parasita, limitando a morbidade e prevenindo a morte do hospedeiro. Esta interação complexa entre o hospedeiro e o parasita promove o equilíbrio e permite a transmissão contínua do parasita sem causar danos nocivos imediatos ao hospedeiro

(King *et al.*, 2001). O parasita apresenta mecanismos de escape sofisticados ao sistema imunitário do hospedeiro definitivo, o que lhe permite habitar os vasos do sistema circulatório por longos períodos. Uma das formas de escape envolve a expressão de antígenos de superfície, interferência do parasita na síntese de citocinas através da indução da apoptose de células de defesa do hospedeiro e modificação da resposta imune ao parasita por interferência com o sistema hormonal através de receptores do próprio parasita (Salzet *et al.*, 2000; Angeli *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002).

### 1.1.7 - Distribuição geográfica de *Schistosoma* spp

Das cinco espécies de *Schistosoma* que parasitam o ser humano são de grande relevância, *S. haematobium*, responsável pela schistosomose urogenital e *S. mansoni* e *S. japonicum* causadoras da forma intestinal da doença, devido à ampla distribuição geográfica e elevada morbidade; as duas restantes espécies, *S. intercalatum* e *S. mekongi*, também causam schistosomose intestinal, mas apresentam uma distribuição mais restrita (Figura 5). De acordo com Rey (2001), espécies zoonóticas de *Schistosoma* que parasitam aves e mamíferos, podem causar reações inflamatórias cutâneas em humanos, denominadas dermatites cercarianas, mas não evoluem até à fase adulta no organismo.

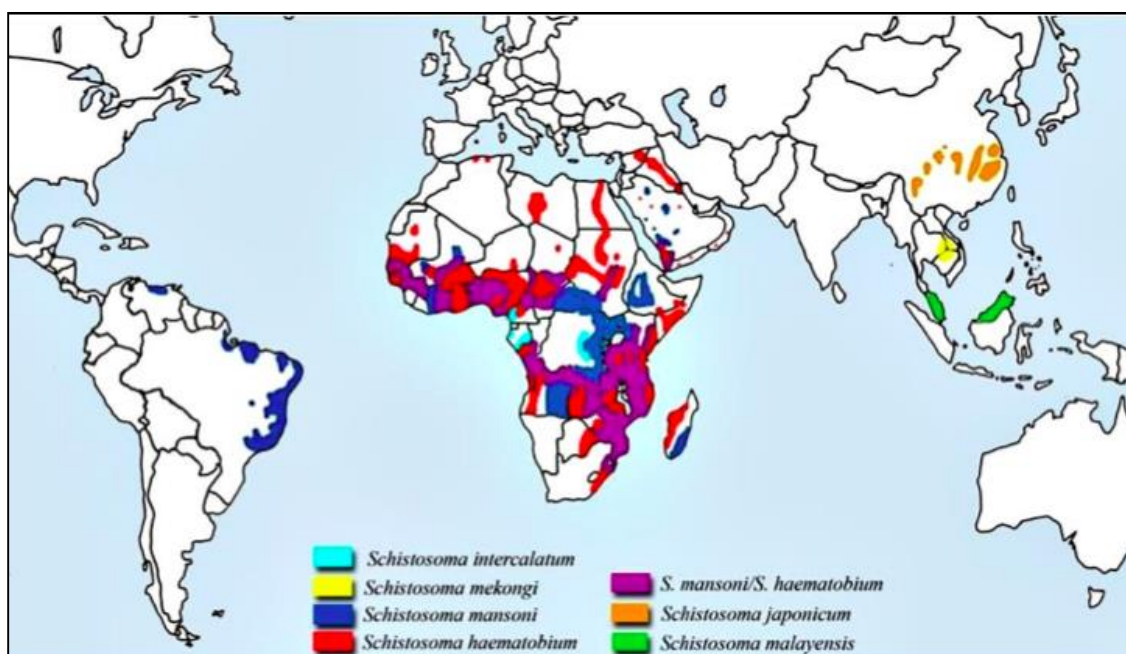


Figura 5. Distribuição geográfica das espécies de *Schistosoma*

(Fonte: <http://www.manole.com.br/clinica>. Acesso a 8-07-2016)

### 1.1.8 - Schistosomose: situação epidemiológica global

A schistosomose (ou bilharziose) é considerada a principal Doença Tropical Negligenciada (DTN) e, segundo a WHO (2013a), a segunda doença parasitária mais devastadora em termos de Saúde Pública e socioeconómicos, imediatamente após a malária, na África Subsaariana. Sendo uma das principais parasitoses humanas com ocorrência mundial, (Figura 5), distribuída pela África, Ásia e América Latina, no Mediterrâneo Oriental e Pacífico Ocidental (Engels *et al*, 2002), encontra-se incluída no Plano Global de controlo das DTN para 2008-2020. De acordo com Chitsulo *et al.*, (2004) e WHO (2012), das mais de 270 milhões de pessoas infetadas no mundo, cerca de 90% residem no continente africano. Para além disso, estima-se que mais de 700 milhões estejam expostos à infeção e cerca de 20 milhões possuam patologia grave.

Das quatro espécies endémicas em África, *S. haematobium* é a predominante e principal responsável pela morbimortalidade nas regiões subsariana e Mediterrâneo oriental. É endémica em 54 países, incluindo Angola, Moçambique e Guiné-Bissau, coexistindo com *S. mansoni*, *S. intercalatum* e *S. guineensis* em algumas zonas (Gryseels *et al.*, 2006). É na região africana que se regista a prevalência mais elevada da parasitose (Figura 6). Quanto à schistosomose por *S. mansoni* é também frequente na América central e do sul, enquanto *S. japonicum* e *S. mekongi* encontram-se nalguns países do sudeste asiático.

Distribution of schistosomiasis, worldwide, 2012

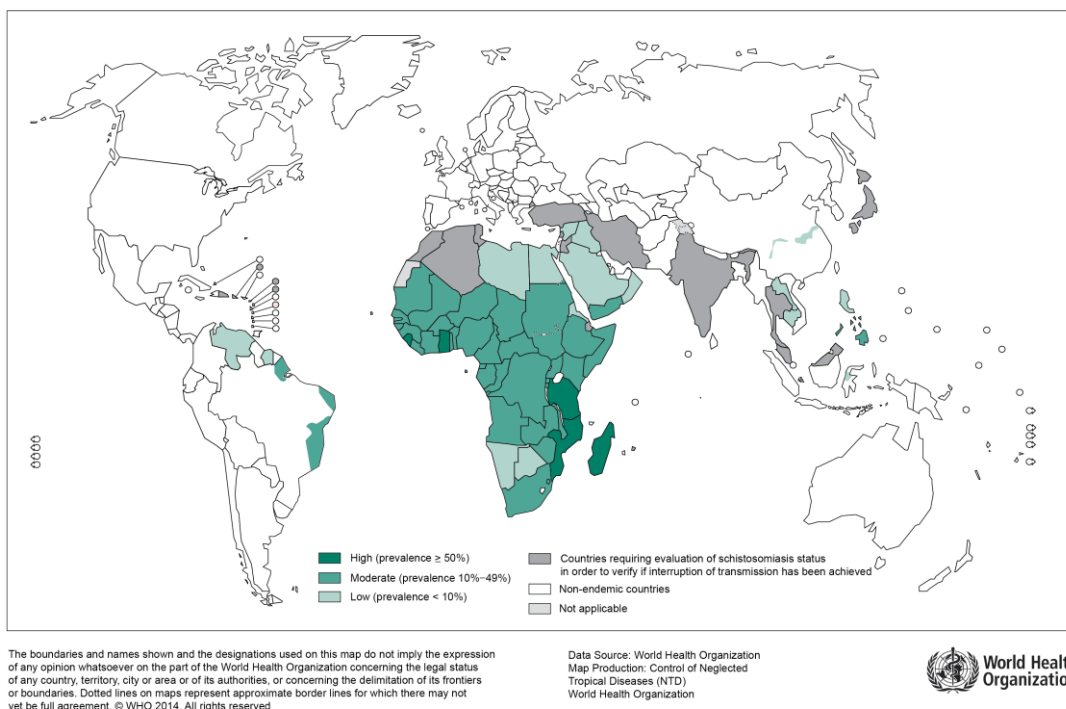


Figura 6 – Classificação da prevalência da schistosomose (WHO, 2012)

De acordo com Engels (2002), a schistosomose embora presente, de um modo geral, um índice de mortalidade baixo, a sua acentuada morbilidade faz com que estes números sejam preocupantes, pelo facto de a doença apresentar um carácter insidioso, não sendo comum o seu diagnóstico nos estágios iniciais, mas a sua evolução, na ausência de tratamento, pode levar ao desenvolvimento de doenças incapacitantes para homens e mulheres, em idades mais produtivas.

A schistosomose está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento económico, que geram a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, de atividades domésticas (lavar roupa e utensílios) e de higiene das populações. Apesar de ser considerada uma doença de áreas agrícolas rurais, assiste-se cada vez mais à presença de focos urbanos (Mungomba & Michelson, 1995; Ribeiro *et al*, 2004; Massara *et al*, 2008; Barbosa *et al*, 2010; Leal Neto *et al*, 2011).

No entanto, a dinâmica populacional de *Schistosoma* spp. é complexa, estando dependente de uma variedade de factores relacionados com os hospedeiros definitivos e



intermediários, nomeadamente o comportamento humano, a imunidade, aspectos sociais e ecológicos, a densidade populacional de caracóis e taxa de infeção, fatores que determinam a magnitude e distribuição populacional dos parasitas nas comunidades humanas e consequente grau de endemicidade.

### 1.1.9 - Situação epidemiológica da schistosomose em África

Só no continente africano, calcula-se que a schistosomose cause 280 mil mortes por ano (Van der Werf *et al.*, 2003) e seja responsável anualmente, por 70 milhões de anos de vida de incapacidade perdidos *DALYs* (*Disability Adjusted Life Years*) (King *et al.*, 2008), sendo este valor superior às estimativas para a malária e comparáveis aos do HIV/AIDS (WHO, 2008). Em 2011, pelo menos 243 milhões de indivíduos continuavam a necessitar de tratamento nesta região africana (WHO, 2013a).

Os grupos populacionais de maior risco incluem as mulheres e crianças (devido às atividades recreativas), bem como agricultores e pescadores. Além disso, estudos sobre percepções e práticas associadas a outras endemias ilustraram a grande influência que exercem os universos social e cultural. Com efeito, um estudo realizado no Gana focando a schistosomose por *S. haematobium*, concluiu que muitos membros da comunidade sabiam da existência da schistosomose urinária, mas não a viam como doença. Muitos entrevistados acreditavam que a cor vermelha da urina era sinal de virilidade, de masculinidade. Outros atribuíam a cor vermelha da urina a uma variedade de cana-de-açúcar que era consumida na região (Taylor *et al.*, 1987; Maghema, 2005).

### 1.2 - Epidemiologia da schistosomose em Angola

Em Angola, a schistosomose é endémica nas 18 províncias, o que corresponde a 100% do território nacional (MINSa, 2000). As duas espécies são *S. haematobium* e *S. mansoni*, sendo *S. haematobium* a espécie dominante amplamente distribuída no país com uma prevalência de 25 a 49% no centro e mais baixa na costa litoral, de 5 a 24% (Figura 7). A espécie *S. mansoni* é restrita nas regiões do planalto central e do Norte. De acordo com Grácio (1980), Chitsulo *et al.* (2000) e Figueiredo (2008), a schistosomose por *S. intercalatum*, aparentemente continua ausente no país.

Estudos efetuados na década de 70 (Séc. XX), incidindo sobre a schistosomose

em crianças (Grácio, 1977/78a,b, 1980), demonstraram prevalências de 46 a 93% para *S. haematobium*, em várias regiões do país, taxas que se mantiveram praticamente inalteradas segundo algumas investigações mais recentes efetuadas na população infantil (Chipopa, 2000; MINSA, 2005).

De acordo com o MINSA (2005), a prevalência global da schistosomose na população infantil em Angola era de 28,0%, (IC95%; 26,6–30,3). Estima-se que a morbilidade anual no país seja de 20.999 mil casos e uma mortalidade de 0.02% de óbitos (MINSA, 2012). Alguns estudos epidemiológicos realçam não só a endemicidade e ampla distribuição da parasitose mas também a sua ocorrência nos diversos grupos etários, com prevalências regionais de 20% a 69% (Maghema, 2005).

Após a interrupção dos programas de controlo durante cerca de 30 anos, os resultados do primeiro estudo epidemiológico efetuado no país neste grupo populacional (MINSA, 2005), utilizando a detecção de microhematúria como indicador *proxy* da infecção por *S. haematobium* (Savioli *et al*, 1990; Ross *et al*, 2002), indicaram uma prevalência global de microhematúria de 28,0% (IC95=26,6-30,3). As zonas de Cabinda, Namibe, sul da Huíla, Cunene e sul de Kuando Kubango apresentaram as prevalências mais elevadas, com 40,6% (IC95=34,3-46,9) e 39,6% (IC95=32,6-46,5), respectivamente. A prevalência mais baixa, 11,8% (IC95=7,8-15,7), foi observada na zona ocidental do país e este de Angola (Figura 8), tendo-se encontrado uma prevalência da hematúria macroscópica de 1,2%, indicador *proxy* da infeção grave por *S. haematobium* (MINSA, 2005).

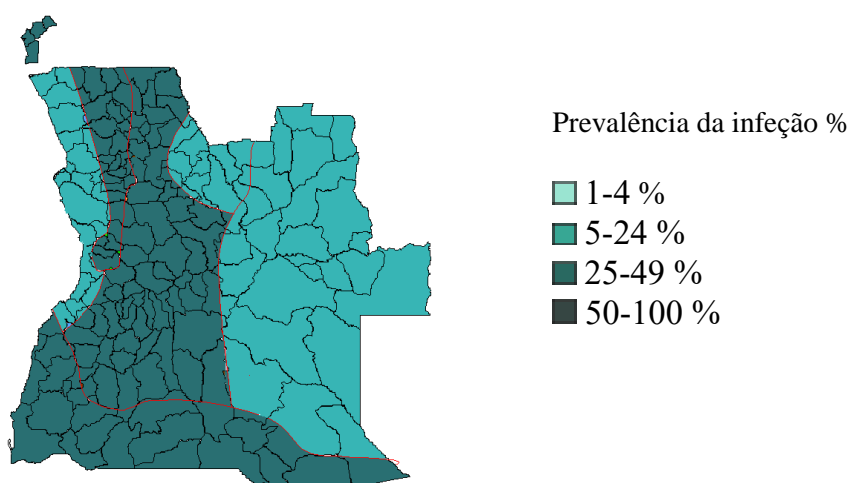


Figura 7 - Distribuição e prevalência da schistosomose por *S. haematobium* em Angola (MINSA, 2005)

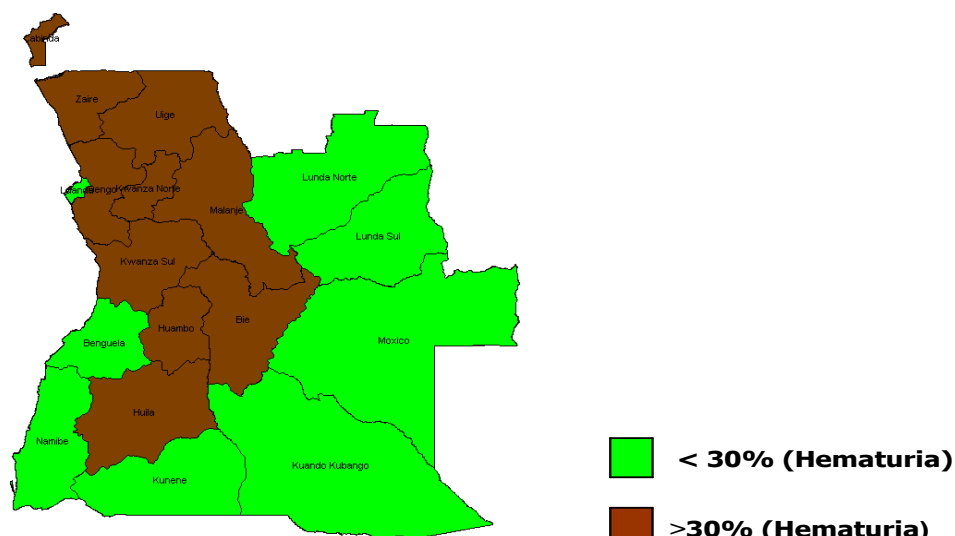


Figura 8 - Prevalência da hematúria em Angola  
(Adaptado de MINSA, 2005)

Em relação à schistosomose intestinal por *S. mansoni*, encontra-se circunscrita às regiões norte e centro do país, afetando consideravelmente tanto a população adulta como a infantil. É endêmica nas províncias de Cabinda, Uíge, Zaire, Malange (Figura 9), com uma prevalência global de 4,5% (MINSA, 2005).

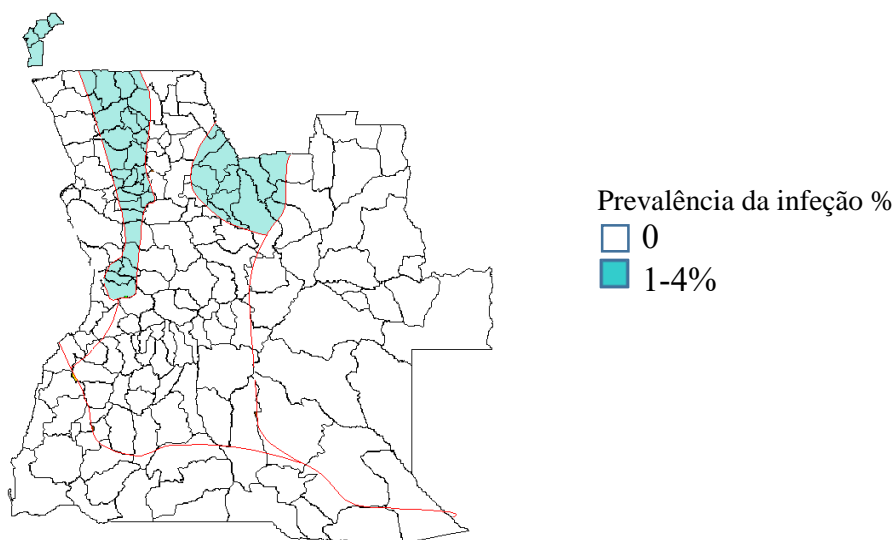


Figura 9 - Distribuição de *S. mansoni* em Angola  
(Adaptado: MINSA 2005 acesso: 15/05/2016)

Quanto aos moluscos hospedeiros intermediários identificados no país, *Bulinus globosus* e *Bulinus africanus* são as espécies envolvidas na transmissão de *S. haematobium* e *Biomphalaria pfeifferi* na transmissão de *S. mansoni* (Grácio, 1980).

### **1.2.1 – Bacia hidrográfica e a schistosomose**

A existência de uma bacia hidrográfica extensa aliada a características geomorfológicas e deficiências socioeconómicas, promovem a existência de fatores epidemiológicos favoráveis à disseminação de *Schistosoma* spp. De um modo geral, Angola possui 47 bacias hidrográficas (Figura 10) sendo a principal rede hidrográfica composta por dez grandes bacias e 7 grandes rios, nomeadamente: bacias do Congo, dos Cuanhamas, do Noroeste Angolano, do Sudoeste Angolano, do Centro Oeste Angolano, do Cuando, do Cuvango, do Cunene, do Kwanza, do Zambeze e do Kubango.

Desta rede de bacias destacam-se os seguintes rios: Kubango, Queve ou Cuvo, Bengo (província que foi alvo do presente estudo), Zaire, Cunene, Kwanza (um dos focos principais da schistosomose por *S. mansoni* e *S. haematobium*) e Rio Dande, (também foi alvo do presente estudo). Tanto o Rio Kwanza como o Zaire são frequentemente utilizados em diversas atividades (Figura 11), incluindo turísticas, devido à sua vasta extensão de navegabilidade.

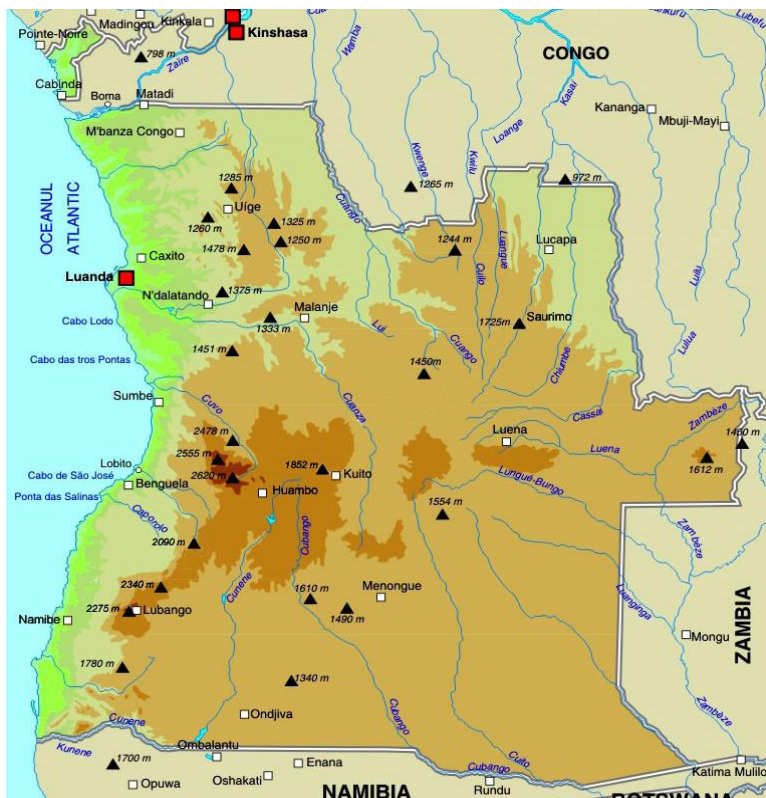


Figura 10 - Bacia hidrográfica de Angola  
(<https://www.ezilon.com/maps/images/africa/Angola>)



Figura 11 – Atividades diárias da população no Rio Bengo  
(Foto I. Jeremias, 05/07/2016)

### **1.2.2 - Breve caracterização geográfica e sociodemográfica de Angola**

Angola está localizada geograficamente na zona climática tropical quente na costa ocidental da África Austral a Sul do Equador, entre os paralelos 04° 22' e 18° 02' de latitude Norte (N) e Sul (S), o que lhe confere apenas duas estações climáticas distintas no ano, a época chuvosa, quente e húmida que vai de setembro a abril e a época fria e seca (cacimbo), de maio a setembro. As temperaturas variam de 18°C a 37°C durante o ano.

O país ocupa uma área de 1.246.700 km<sup>2</sup>, com uma costa de 1.650 km e uma fronteira terrestre de 4.837 km, tendo os seguintes limites territoriais politicamente divididos: a norte a República Democrática do Congo (RDC) e a República do Congo (RC); a sul a República da Namíbia, a este a RDC e República da Zâmbia, e a oeste o Oceano Atlântico. Possui ainda uma fronteira descontínua, a do território de Cabinda, com 421 Km, que faz fronteira com dois países a RC e a RDC em 201 Km.

A sua divisão político-administrativa compreende 1.271 povoações, 536 comunas, 164 municípios e 18 províncias, nomeadamente: Bengo, Benguela, Bié, Cabinda, Cunene, Huambo, Huíla, Kwanza Norte, Kwanza Sul, Kuando Kubango, Lunda Norte, Lunda Sul, Malange, Moxico, Namibe, Uíge, Zaire e Cabinda. É um país multicultural e multilinguístico, tendo o português como língua oficial e conta com nove grupos etno linguísticos, com mais de 18 línguas nacionais. A população residente é estimada em aproximadamente 25 milhões de habitantes, sendo o índice de juventude da população (percentagem da população com menos de 20 anos de idade) estimado em 60% (PNUD, 2005); FNUAP, 2017). Cerca de 37% da população vive abaixo da pobreza e a taxa de alfabetização é de 42%. A igualdade de género continua a ser um grande desafio a nível nacional, sobretudo em termos de acesso à escola secundária, com um *ratio* de cinco meninos para cada menina (PNUD, 2010).

O perfil epidemiológico do país é caracterizado pelas grandes endemias nomeadamente a Malária, Tuberculose, HIV, doenças tropicais negligenciadas (DTN) com destaque para a Schistosomose, Filarioses e Geohelmintoses, com efeitos negativos consideráveis a nível familiar e geral (PNUD, 2010).

A situação de instabilidade vivida em Angola entre 1975 e 2002, caracterizada

por um conflito militar que durou quase trinta anos, com consequente destruição e degradação das infraestruturas económicas e sociais, debilitando o funcionamento dos serviços de saúde, educação e proteção social (MINPLAN, 2005). Quanto ao sistema de saúde, existe um médico por 10.000 habitantes, sendo de 13 o número de enfermeiros por 10.000 habitantes. Os gastos totais do governo em saúde foram de 6,68% entre 2001 a 2012, tendo as despesas da saúde variado de 2,7% a 3,40% do PIB, valores que são considerados ainda muito baixos (PNUD, 2010; WHO, 2013b). Quanto aos indicadores de desenvolvimento humano e apesar da evolução do rendimento *per capita* na última década, ainda se situam abaixo dos valores de referência (HDR Report, 2013).

A maior parte da população tem baixo nível de escolaridade e consequentemente baixas condições socioeconómicas. De acordo com a UNPAF (2015-2019), o acesso a serviços públicos básicos, nomeadamente água, energia, saúde, educação, saneamento e habitação, apesar de estar a melhorar, ainda continua limitado. Estima-se que apenas 43% da população tenha acesso a água potável (WHO, 2013b), sendo visível a assimetria entre as regiões e uma pressão demográfica nos centros urbanos, sobrecarregando os serviços e estruturas públicas, o que constitui um fator de limitação para o desenvolvimento socioeconómico e humano do país. O aumento da população e as necessidades correspondentes de energia e água, muitas vezes resultam em esquemas de desenvolvimento e modificações ambientais e que também leva ao aumento da transmissão da doença. Devido à ausência de rede de canalização, grande parte da população tem contato com os rios, desenvolvendo assim as suas atividades domésticas e profissionais como a pesca e agricultura, bem como as recreativas por parte das crianças.

Na tentativa de minimizar o problema, as autoridades regionais têm vindo a implementar a construção de tanques de tratamento de água e fontanários; contudo, a população continua a recorrer a cursos de água doce, dificultando as medidas preventivas de exposição às fontes de infeção. Este aspeto reforça a necessidade de outras abordagens de intervenção, nomeadamente, o conhecimento de fatores sociais e culturais na aceitação e adoção de comportamentos (Barbosa, 1995; Uchôa, 2000).

### 1.3 - Diagnóstico da schistosomose

Os métodos diretos, para a detecção e identificação de ovos de *Schistosoma* spp nos excreta (urina e fezes), através da microscopia óptica, continuam a ser os mais utilizados no diagnóstico laboratorial da schistosomose. No entanto, é reconhecida a sua baixa sensibilidade sobretudo em casos de baixa carga parasitária ou em infeções mistas e no caso de híbridos (Huyse *et al*, 2009; Oliveira *et al*, 2010), por isso torna-se necessário recorrer a outros métodos complementares, nomeadamente a determinação e identificação de antígenos ou anticorpos, bem como a detecção de fragmentos específicos de DNA do parasita.

#### 1.3.1 - Métodos parasitológicos

Os métodos parasitológicos utilizados para o diagnóstico da schistosomose consistem em dois tipos, nomeadamente qualitativos, que detectam a presença de ovos dos parasitas nas fezes e urina, e os quantitativos que, para além da identificação, permitem quantificar o número de ovos presentes nas amostras de fezes e de urina. São métodos pouco dispendiosos e específicos, mas a sua desvantagem reside na baixa sensibilidade, principalmente nas áreas de baixa intensidade de parasitismo (De Vlas & Gryssels, 1996; Barreto *et al*, 1990; Ebrahim *et al*, 1997). Os factores que concorrem para esta limitação são, entre outros, a baixa intensidade e/ou a infeção por formas imaturas de parasita (Cheveer & Powers, 1968; Engels *et al*, 1997). De acordo com Chieffi & Kanamura (1978), os exames parasitológicos negativos não significam necessariamente que os indivíduos não estejam infetados pelo que, ao avaliar a prevalência por meio de técnicas parasitológicas, pode-se ter uma ideia falsa da realidade, subestimando a prevalência real, com importantes consequências para o controlo da infeção (De Vlas & Gryssels, 1992; Enk *et al*, 2008).

Em inquéritos epidemiológicos populacionais e investigações epidemiológicas, a técnica de filtração da urina é a recomendada pela WHO (1991) para detecção e quantificação da carga parasitária de *S. haematobium* (num volume de 10 ml), enquanto o método de Kato-Katz (Katz *et al*, 1972) é o recomendado para as espécies responsáveis pela schistosomose intestinal e também útil para helmintas intestinais tais como *Ascaris*



*lumbricoides*, *Trichuris tricuris*, Ancilostomídeos e *Taenia* sp., permitindo classificar a intensidade do parasitismo em baixa, moderada e pesada, de acordo com o número de ovos existentes por grama de fezes.

A utilização de métodos indiretos, como a detecção de hematúria macro e microscópica, em estudos epidemiológicos apenas tem sido aplicada a *S. haematobium*, uma vez que a presença de eritrócitos na urina, visível a olho nu (hematúria macroscópica) ou mediante tiras reativas (hematúria microscópica), é um indicador sensível da infecção parasitária sobretudo em crianças.

### 1.3.2 - Métodos imunológicos

As técnicas de imunodiagnóstico constituem alternativas aos métodos parasitológicos e têm como alvo a detecção de antígenos parasitários ou de anticorpos dirigidos contra esses antígenos. Das mais utilizadas destaca-se a técnica de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para o diagnóstico em massa (Oliveira *et al*, 2003), por apresentar baixo custo, alta reprodutividade e facilidade de execução. Outras técnicas como a Imunofluorescência direta e indireta e reação periovular têm sido também utilizados em alguns estudos clínicos e epidemiológicos, mas em casos mais limitados, devido à exigência de equipamento e condições laboratoriais mais onerosos. No entanto, os métodos imunológicos podem apresentar algumas limitações em relação à especificidade, devido à coendemicidade com outros parasitas em muitas regiões, induzindo a reações cruzadas. Outro inconveniente reside no facto de serem métodos invasivos, uma vez que é necessário recorrer à colheita de sangue.

Para detecção de antígenos circulantes, geralmente recorre-se à captura de antígeno por anticorpos monoclonais. Na maior parte utilizam-se dois dos principais antígenos que envolvem as glicoproteínas, o antígeno circulante anódico (CAA) e o antígeno circulante catódico (CCA) com proveniência do epitélio intestinal dos parasitas, em que a presença destes antígenos indicam a presença de infecção ativa (Deelder & Kornelis, 1980; De Jonge *et al*, 1991; Rabello, 1997). A sua principal desvantagem devia-se ao facto de exigirem o tratamento prévio da amostra além de apresentarem uma sensibilidade baixa no caso de baixas prevalência e intensidade da infecção, bem como o seu alto custo. Contudo, estes aspetos parecem ter sido ultrapassados na sua atual

apresentação em formato imunocromatográfico (em avaliação), a aplicar na urina, o que poderá ser uma alternativa de fácil utilização no terreno e não invasiva (Danso-Appiah *et al*, 2016) para *S. mansoni* e possivelmente também para *S. haematobium*.

### 1.3.3 - Métodos moleculares

Ao longo da última década, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tornou-se uma técnica generalizada para o diagnóstico e diversos ensaios genéticos baseados em amplificação seletiva de DNA. A técnica da PCR baseia-se na amplificação seletiva de uma quantidade reduzida de DNA e permite obter múltiplas cópias de um segmento de DNA. De acordo com a literatura científica, os ensaios de PCR são caracterizados por elevadas sensibilidade e especificidade na detecção de DNA do parasita em amostras biológicas (Enk *et al*, 2012).

A demonstração de que os métodos moleculares (PCR) são altamente sensíveis e específicos para detecção de DNA de *Schistosoma* em amostras de urina e fezes de humanos, permitiu um grande avanço a nível do diagnóstico da parasitose (Oliveira *et al*, 2010; Ibrónke *et al*, 2011). A sua principal limitação foi sempre a reduzida quantidade de material genético disponível para o estudo. Várias técnicas de biologia molecular, nomeadamente PCR convencional, PCR em Tempo-real, RAPD-PCR (Random Amplified Polymorfism), RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorfism), Nested-PCR e Microssatélites, têm sido aplicadas atualmente à schistosomose, as quais se descrevem resumidamente:

#### Técnica da PCR convencional

A PCR é uma técnica que consiste na amplificação sensível de detecção do DNA numa amostra ou fragmento que esteja presente. Em 2001, Hamburger *et al* descreveram sequências altamente repetitivas do genoma de *S. mansoni*. Os primeiros trabalhos sobre a detecção de DNA específico de *Schistosoma* para determinação da infeção em moluscos hospedeiros intermediários do parasita foram publicados em 1997 (Hanelt *et al*, 1997; Janotti-Passos *et al*, 1997).

De acordo com Alberts (1997), esta técnica veio revolucionar a Medicina Forense por permitir a identificação do indivíduo a quem pertence a amostra pelo seu *fingerprint*

genético. No decorrer da reação da PCR, um segmento de ácido desoxirribonucleico (DNA) de dupla hélice ou simples é amplificado através de ciclos sucessivos. Esta técnica está fundamentada em três reações, que ocorrem em diferentes temperaturas de incubação e que consistem (1) na desnaturação das fitas do DNA-alvo; (2) seguida pela etapa de hibridização das sequências de iniciadores (que são pequenas sequências de DNA sintetizadas, complementares às sequências conhecidas de DNA-alvo); (3) e finalmente a etapa de extensão da região flanqueada pelos iniciadores.

Apesar da sua sensibilidade e especificidade no diagnóstico de parasitoses intestinais, a PCR apresenta algumas dificuldades quanto ao processo de extração do DNA em fezes, devido à complexidade do material biológico uma vez que as fezes possuem enormes quantidades de substâncias capazes de inibir a ação da enzima (Taq polimerase) necessária para a realização do processo.

De acordo com Mullis & Faloona (1987), uma outra desvantagem reside na possibilidade de contaminação, durante a manipulação, devido a termosensibilidade da enzima (Taq DNA-polimerase), o que pode levar ao surgimento de bandas inespecíficas. Substâncias como bilirrubina, etanol, complexos de polissacarídeos, sais biliares e outras interferem significativamente na reação de PCR (Saiki *et al*, 1985; Monteiro *et al*, 1997; Vandenberg & Oorschot, 2002).

No entanto, a otimização desta metodologia tem demonstrado a sua aplicação em amostras fecais para detecção de *S. mansoni*, bem como de outras espécies causais de schistosomose intestinal (Gomes *et al*, 2010; Schwarz *et al*, 2014, Ferrer *et al*, 2015; Siqueira *et al*, 2015).

### **Nested-PCR**

É uma técnica que consiste em aumentar a sensibilidade de detecção. A técnica de PCR tem sofrido algumas adaptações, como por exemplo, a dupla amplificação (Nested-PCR). Nesta técnica, o ensaio é realizado em duas etapas consecutivas (duas PCRs simples). Na primeira etapa, uma sequência maior de DNA alvo é amplificada com um par de *primers* (sequências iniciadoras) externos. Uma alíquota do produto de PCR obtido, é então submetida à segunda etapa, para amplificação de uma sequência interna do DNA alvo, usando-se um novo par de *primers* (internos em relação à posição de hibridização do primeiro par utilizado). Assim, no final desta última etapa obtém-se a

sequência alvo interna amplificada que pode ou não se sobrepor a uma das terminações finais da sequência alvo maior.

É a segunda etapa de amplificação com oligonucleótidos internos que confere à Nested-PCR especificidade e sensibilidade superiores às obtidas por uma PCR simples. A sua elevada sensibilidade torna a Nested-PCR, inclusive, altamente recomendada para a detecção de alvos de agentes patogénicos com baixo número de cópias, por exemplo, em amostras clínicas, de solo, de água e alimentos (Dupin *et al.*, 2002), e também para a detecção de *Schistosoma* spp em infeções leves, com baixa carga parasitária ou em infeções ectópicas (Utzinger *et al.*, 2015; Bruscky *et al.*, 2016)

### **PCR em tempo real**

A técnica de PCR em tempo real permite a visualização dos ciclos durante o curso da amplificação, manter o registo dessa evolução e permite estimar a concentração de DNA alvo nas amostras. Esta técnica é baseada na detecção de fluorescência, mediante a utilização de um corante SYBER® Green 1, ou recorrendo a sondas oligonucleótidas específicas como as TaqMan (Yoshimura *et al.*, 2005), com propriedades similares às de um termociclador (Rivas, *et al.*, 2001). É um método de detecção bastante usado em ensaios de PCR quantitativo em tempo real. Os *primers* específicos utilizados na reação devem ser desenhados com bastante cuidado devido o risco de amplificação de produtos inespecíficos e formação de dímeros, pelo facto do corante ser altamente sensível e ligar-se a qualquer DNA de dupla hélice.

Pelo facto de se realizar a monitorização em tempo real, elimina a necessidade de detecção dos produtos amplificados por eletroforese e simplifica a PCR quantitativa pela possibilidade de identificação do ciclo no qual a amplificação se inicia: ciclo máximo do *threshold* na reação de PCR em tempo real (Ct).

Diversos estudos têm demonstrado a sua aplicabilidade no diagnóstico da schistosomose urogenital e intestinal com resultados promissores (Vinkeles *et al.*, 2014; Gordon *et al.*, 2015;; Sady *et al.*, 2015).

### **RFLP-PCR (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)**

RFLP-PCR é uma técnica que consiste em explorar as variações nas sequências homólogas de DNA. A técnica baseia-se na especificidade de restrição de endonucleases que são altamente específicas de sequências de cadeia dupla de DNA. Na análise de RFLP, o DNA é quebrado em pedaços e digerido por enzimas de restrição; os fragmentos resultantes da restrição são separados de acordo com os seus comprimentos por eletroforese. A ação de restrição de enzimas produz comprimentos variáveis de sequências menores ou polimorfismos. O RFLP é uma ferramenta importante na impressão digital genética, na identificação de genes em caso de doenças genéticas, mapeamento do genoma e na determinação do risco de doenças.

Os marcadores RFLP também são utilizados para diferenciar entre dois organismos ou espécies. Ao realizar a análise de RFLP, o DNA alvo é normalmente submetido à reação de PCR, que produz milhões de cópias de filamentos de DNA idênticas ao original. Este DNA amplificado é combinado com um conjunto de enzimas de restrição, que clivam o DNA em locais específicos. A aplicação desta metodologia tem permitido aprofundar o conhecimento não só sobre a diversidade genética das populações de *Schistosoma* e dos seus hospedeiros intermediários, mas também sobre a identificação de genes potencialmente associados à suscetibilidade à infecção e a fármacos schistosomicidas (Teodoro *et al*, 2011; Marques *et al*, 2014; Quan *et al*, 2015; Caldeira *et al*, 2016).

### **1.4 - Controlo da schistosomose**

A principal estratégia para o controlo da schistosomose tem sido a quimioterapia em massa (Spear *et al*, 2011), reconhecendo que o acesso à água potável e saneamento adequado continuam a ser um desafio em muitos países em desenvolvimento (Andrade, 1998). Na África, a Tunísia é o único país a ter conseguido erradicar a schistosomose, devido ao cumprimento dos programas de controlo desde 1982, realizados em todo o país (Rey, 2001). O tratamento e o controlo da schistosomose são baseados na administração do Praziquantel (PZQ), no saneamento ambiental, controlo de moluscos, abastecimento de água e na educação ambiental e em saúde. A provisão de água canalizada tem o

benefício de prevenir o contato humano com coleções de água contaminadas por cercárias. O controlo de moluscos visa reduzir a sua densidade populacional e, consequentemente, a diminuição de cercarias no respetivo habitat.. Já a educação ambiental e em saúde tem como objetivo fortalecer o exercício da cidadania através da participação de toda a população no contexto e no quotidiano do controlo da schistosomose. Com efeito, vários autores enfatizam a necessidade de enraizar as ações educativas e o planeamento em saúde mediante o conhecimento prévio dos fatores sociais e culturais que influenciam a aceitação e participação das populações num determinado programa. Como nenhuma das medidas acima se tem mostrado efetiva por si só, o sucesso do controlo da schistosomose depende de seu uso combinado, levando em conta as peculiaridades de cada área.

Desde 1980, o Praziquantel (PZQ) tornou-se disponível e demonstrou ser um fármaco eficaz na luta contra o schistosomose. O fármaco tem efeitos adversos mínimos e baixo custo, sendo por esse motivo um instrumento útil em programas de saúde pública que visam o controlo desta doença (Doenhoff, *et al*, 2009).

O tratamento com este anti-helmíntico não só erradica o parasita, como também reverte a resposta inflamatória responsável pelas manifestações crónicas da doença, (Summer *et al*, 2006; Mascarenhas & Castro, 2011). Os principais efeitos colaterais referidos após administração do PZQ incluem cefaleias, náuseas, vômitos, diarreia e cólicas abdominais cuja severidade e a sua frequência estará relacionada com a intensidade da infeção (Polderman *et al.*, 1984).

Este fármaco tem atividade moderada contra schistosómulos, as formas jovens do parasita (Doenhoff *et al.*, 2008; Manneck *et al.*, 2010). Apesar da sua eficácia, o tratamento não impede a reinfeção. Um dos aspetos, ainda pouco estudado, é a possibilidade de algumas espécies de *Schistosoma* apresentarem resistência natural ou induzida ao fármaco (Raso *et al.*, 2004), o que será um problema grave uma vez que irá comprometer o controlo nas áreas endémicas a longo prazo (King, 2006; Liang *et al.*, 2007). De acordo com King *et al*, (2006; 2007), a quimioterapia em massa pode levar à seleção de parasitas resistentes ao PZQ em particular nas áreas de maior pressão terapêutica.

A quimioterapia em massa tem duplo benefício: reduzir a morbidade causada pela presença dos vermes adultos no hospedeiro humano e diminuir o número de ovos eliminados no ambiente. Contudo, diferenças na resposta ao PZQ têm sido relatadas por vários autores, sendo importante monitorizar eventuais alterações induzidas pelo PZQ na genética e estrutura populacional de *Schistosoma*. Desde 1955 que têm sido observadas diferenças na susceptibilidade aos fármacos específicos por estirpes geográficas de *S. mansoni* (Gonnert & Vogel, 1955). Em relação ao PZQ, o primeiro caso preocupante ocorreu no Senegal, em que se observou uma taxa de cura baixa, 18-39% (Gryseels *et al*, 1994 e Stelma *et al*, 1995). Na opinião de Doenhoff *et al.*, (2002) a menor sensibilidade poderá ser devida à intensidade do parasitismo e/ou a elevadas taxas de infecção e reinfeção responsáveis pela presença concomitante de vermes imaturos e adultos, considerando que o fármaco não afeta os vermes imaturos.

Atendendo a que o modo de ação do PZQ ainda não é totalmente conhecido, o fenómeno de menor sensibilidade/resistência pode envolver diversos mecanismos, nomeadamente características genéticas naturais e/ou adquiridas, dentro da mesma espécie (Greenberg, 2013).

### 1.5 - Variabilidade genética de *Schistosoma* spp.: implicações no controlo

A variabilidade genética inter e intra-espécies, inter e intra-populações de *S. haematobium* e *S. mansoni* tem sido observada em variadas áreas geográficas. As alterações fenotípicas (morfológicas), a diminuição da sensibilidade aos fármacos, as diferenças nas infetividade aos hospedeiros definitivos e intermediários, patogenicidade e imunogenicidade induzidas pelos parasitas, serão consequências da eventual variabilidade genética nestas espécies (Rollinson *et al*, 1986; Brouwer, *et al*, 2003; Norton *et al*, 2010; Gasmelseed *et al*, 2014). Estas alterações genéticas influenciam na variação do fenótipo e consequentemente a relação hospedeiro-parasita com reflexos na patologia e na epidemiologia (Glenn *et al*, 2013; Akinwale *et al*, 2014; Webster *et al*, 2015).

A redução da diversidade genética resultante da quimioterapia pode indicar que a população será menos capaz de se adaptar a uma série de pressões quer ambientais quer quimioterapêuticas (Tran *et al.*, 2006; Webster *et al*, 2008; Gentile & Oliveira, 2008). Por

outro lado, o aumento da diversidade ou a mudança genotípica pode indicar um maior intercâmbio genético de uma população de parasitas com outras populações em áreas geograficamente diferentes e espécies hospedeiras da schistosomose (Standley *et al.*, 2012a; 2012b).

Deste modo, o estudo da genética das populações, incluídos nos estudos de programas de prevenção com quimioterapia em larga escala, contribuem para melhorar a compreensão da diversidade genética das populações de *Schistosoma*, do seu fluxo genético nos hospedeiros, assim como monitorizar qualquer alteração significativa na população de parasitas na sequência do tratamento (Webster *et al.*, 2008; Gower *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2015).



## **2. Objetivos**

## 2. Objetivos

Atendendo ao facto de Angola ser um país endémico para a schistosomose e na perspectiva de o programa de controlo ser aplicado de forma regular e de ter cobertura nacional, torna-se necessário obter indicadores mais precisos sobre a prevalência da parasitose, incluindo potenciais efeitos hematológicos adversos associados ao parasitismo, assim como monitorizar a eficácia do tratamento e de outras medidas de controlo implementadas. Neste sentido, a otimização de técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas serão um complemento adicional relevante tanto para o diagnóstico inicial como para o controlo pós-terapêutico. Por outro lado, pouco se sabe sobre a estrutura genética e distribuição geográfica das populações de *S. haematobium* e de *S. mansoni* endémicas no país, conhecimento que poderá esclarecer alguns aspetos sobre as diferenças regionais observadas pelos clínicos, a nível da resposta ao tratamento e da patologia, particularmente no caso da schistosomose urogenital.

Deste modo, o presente estudo exploratório teve como objetivos:

- Atualizar a informação sobre a ocorrência das espécies de *Schistosoma* spp endémicas e as suas implicações nas comunidades das províncias de Luanda, Bengo, Malange e Huíla;
- Comparar a sensibilidade e especificidade da técnica da PCR convencional em relação aos métodos parasitológicos, para detecção de *S. haematobium* e de *S. mansoni* em amostras de campo, obtidas nas comunidades das províncias referidas;
- Analisar a existência de eventual variabilidade genética intraespécie e inter-regional de isolados de ovos de *S. haematobium* e de *S. mansoni*, obtidos a partir de amostras de urina e de fezes de residentes nas províncias de Luanda, Bengo, Malange e Huíla, utilizando marcadores de RAPD-PCR e de microssatélites.

### **3. Material e Métodos**

### 3. Material e Métodos

### 3.1 - Locais e população

O estudo decorreu em Angola, nas províncias de Luanda, Bengo, Malange e Huíla (Figura 12) e incluiu utentes que acorreram ao laboratório do Instituto Nacional de Saúde Pública (INSP) por indicação médica e a população que integrou o estudo epidemiológico que realizámos naquelas províncias (após autorização do Ministério da Saúde, Anexo 1).

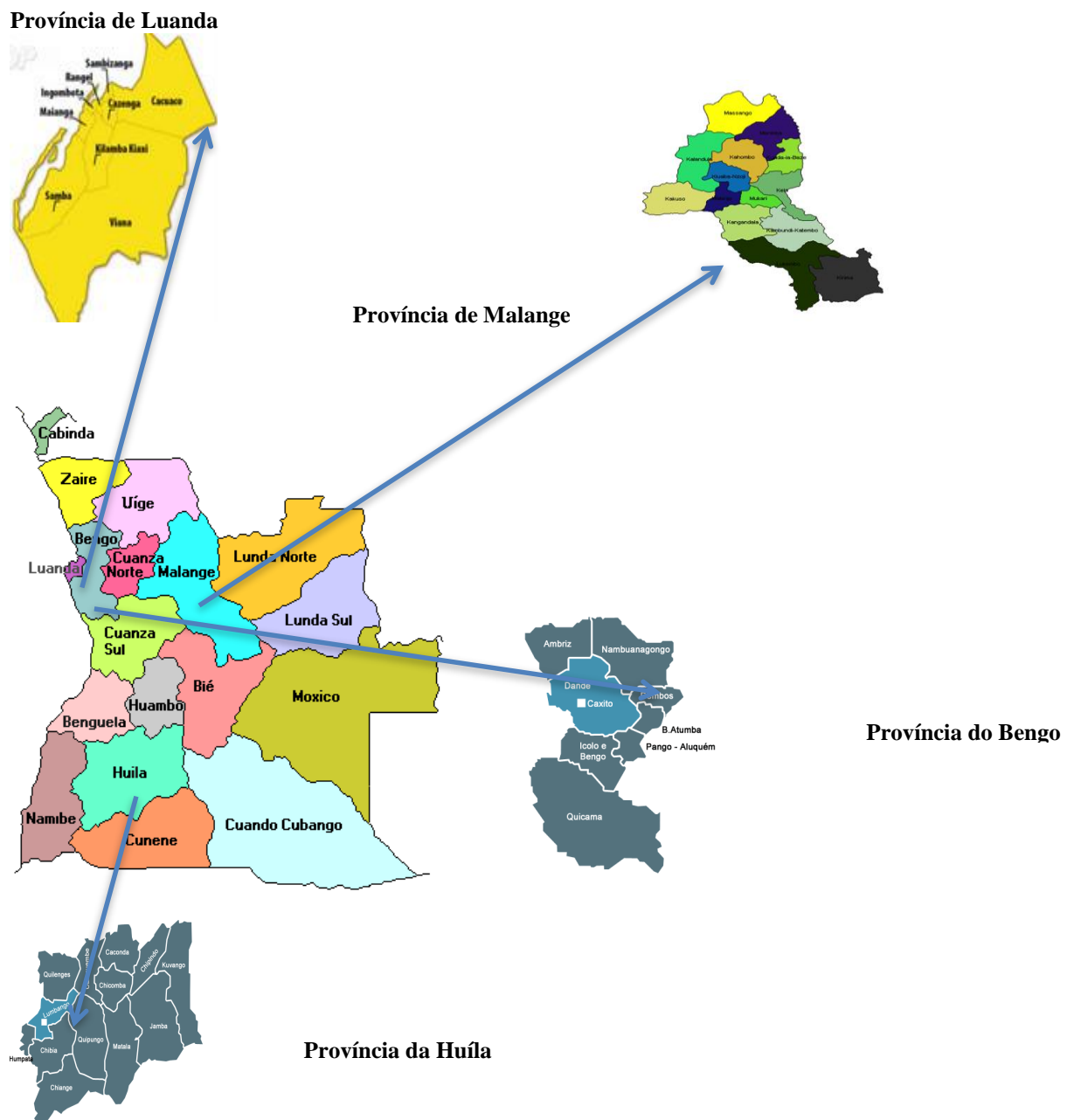


Figura 12 - Províncias angolanas onde decorreu o estudo

### **3.1.1 - Província de Luanda**

A Província de Luanda, onde se situa a capital Luanda, é a segunda província mais pequena do país, em termos de dimensão, com 18.826 km<sup>2</sup> de área, possui uma população de aproximadamente 7,1 milhões de habitantes, com 347 pessoas por cada km<sup>2</sup>, apresentando uma enorme assimetria geográfica em termos de densidade demográfica, visivelmente acentuada nos municípios de Cazenga e Luanda, com 23.306 e 18.169 habitantes por km<sup>2</sup>, respetivamente. Localizada na costa do Oceano Atlântico, tem fronteira com a província do Bengo, é composta por seis distritos (Kilamba Kiaxi, Maianga, Rangel, Sambinzanga, Samba e Viana) e sete municípios (Cacuaco, Belas, Cazenga, Viana, Quissama, Ícolo e Bengo e Luanda).

Estima-se que mais de 70% da população viva em zona suburbana, sendo a província com maior crescimento económico e social, por ter sofrido poucos efeitos durante a guerra civil. Apesar de não existirem rios de grande caudal que desemboquem no litoral da cidade, possui vários cursos de água que formam o sistema de bacias fluviais de Luanda. Os rios mais próximos são o Kwanza (maior rio de Angola) e o rio Bengo.

#### **Instituto Nacional de Saúde Pública (INSP)**

No INSP foi efetuado o diagnóstico parasitológico a adultos e jovens, solicitado pelos seus médicos, por suspeita clínica de schistosomose urogenital e intestinal (hematúria, sangue nas fezes, entre outras queixas). Estes utentes, que voluntariamente acederam participar no estudo, foram inquiridos sobre algumas informações individuais relevantes para o estudo, nomeadamente: idade, profissão, escolaridade, condições socioeconómicas e conhecimento da schistosomose (Anexo 2.4).

#### **Município da Funda (Cacuaco)**

Por solicitação do Departamento de Saúde Escolar, foi efetuado um inquérito parasitológico em crianças de idade escolar do município da Funda (pertencente à província de Luanda), em virtude de apresentarem hematúria (Figura 13).



Figura 13- Escola do ensino primário da Funda/Cacuaco (Foto I. Jeremias)

### 3.1.2- Província do Bengo

A Província do Bengo, localiza-se no Norte do país, a 55 km de Luanda. A sua capital é a cidade do Caxito e possui cerca de 41.000 km<sup>2</sup>, com 461 mil habitantes e é composta por seis municípios: Ambriz, Bula Atumba, Dande, Dembos, Nambuangongo e Pango Aluquém. O estudo decorreu no período de 10 a 15 de agosto de 2015, com participação de adultos e escolares do ensino primário.

### 3.1.3 - Província de Malange

A cidade de Malange é a capital da Província que possui uma área de 98.302 Km<sup>2</sup> e uma população de aproximadamente 998.000 habitantes. É constituída pelos municípios de Cacuso, Caombo, Kalandula, Cambundi-Catembo, Cangandala, Cuaba, Nzogo, Cunda-Dia-Baze, Luquembo, Marimba, Massango, Mucari, Quirima, Quela e Malange (os dois últimos alvos do estudo). Está situada no Nordeste de Angola e a sua altitude vai de 500 m a 1500 m. A agricultura e produção de carne bovina são as principais atividades da população, constituída por diferentes grupos etnolinguísticos: Quimbundos, Bangalas, Bondos e Songos que ocupam a parte Central e Sul, os Gingas a norte e Umbundos, Quiocos, Suelas na zona do planalto. Para além da agricultura de subsistência, as principais atividades são a caça e a pesca artesanal.

A primeira fase do estudo decorreu no período de 26 de outubro a 9 de novembro de 2011. Foi realizada no Hospital central, na sede de Malange, bem como na escola primária de Cahala e nas aldeias de Ngola Kabila I e II, Quela, (Figura 14), pertencentes

ao Município do Quela situado a 115 Km a Leste da cidade de Malange, com uma população estimada de 15 mil habitantes. Procedeu-se ao inquérito epidemiológico de schistosomose na população (adultos e crianças em idade escolar e adultos que acorreram ao hospital central) e colheita de amostras biológicas (de urina, fezes e sangue). A segunda fase decorreu em março de 2012, com a finalidade de se proceder ao controlo pós-tratamento dos indivíduos previamente tratados com PZQ.



Figura 14 – Fonte de infeção de schistosomose Quela/Malange (Foto I. Jeremias)

#### **3.1.4 - Província da Huíla**

A província da Huíla está localizada no Sudoeste de Angola e apresenta os seguintes limites e fronteiras: a Norte as províncias de Benguela e do Huambo, a Sul a Província do Cunene, a Este as províncias do Bié e do Cuando Cubango e a Oeste as províncias do Namibe e de Benguela. A sua capital é o Lubango e tem uma área de 75.002 Km<sup>2</sup> e uma população de 680.000 habitantes, sendo a população total da província estimada em 2,3 milhões de habitantes. A densidade populacional é de cerca de nove (9) pessoas por Km<sup>2</sup>. O clima varia entre o tropical de altitude, no Centro Norte e no Planalto da Humpata é o semiárido nas áreas de menor altitude. A temperatura média é entre 19° C e 21 °C e a precipitação média entre 600 e 1200 mm<sup>3</sup>. A cidade do Lubango possui duas estações: estação chuvosa e estação seca (cacimbo), as temperaturas oscilam entre 15°C e 19°C, com acentuada amplitude térmica diária, ausência de pluviosidade e

consequentemente humidade relativa do ar muito baixa. Possui 14 municípios nomeadamente, Caconda, Cacula, Caluquembe, Chiange, Chibia, Chicomba, Chipindo, Cuvango, Humpata (foi alvo do estudo), Quilengues, Quipungo, Matala, Jamba e Lubango.

### **Município da Humpata**

Este Município tem cerca de 150 mil habitantes e uma área de 1261.25 km<sup>2</sup>, uma densidade populacional de 24.58 habitantes /Km<sup>2</sup> e uma altitude de 1937 m. Possui uma considerável rede hidrográfica subterrânea que apresenta constantemente uma superfície caudal (Figura 15). As terras são bastante férteis sendo a agricultura a sua atividade principal.



Figura 15 - Curso de água permanente, Município da Humpata/Huíla (Foto I. Jeremias)

O estudo decorreu de 20 de agosto a 3 de setembro de 2015 no centro médico do Município da Humpata (Figura 16) em indivíduos adultos, crianças e mulheres grávidas que acederam àquele Centro. Os utentes que voluntariamente aceitaram participar no estudo, foram inqueridos quanto a algumas informações individuais: idade, profissão, escolaridade, condições socioeconómicas, conhecimento da schistosomose e presença de hematúria, informações relevantes para o estudo (Anexo 2.4 ).





Figura 16 - Centro Médico do Município da Humpata/Huíla (Foto I. Jeremias) 20/08/2016

### 3.2 - Sensibilização da população nas províncias em estudo

Para dar início ao estudo, contactou-se previamente os administradores “Sobas” das aldeias, os enfermeiros, os professores e seguidamente procedeu-se à sensibilização da população alvo. Informou-se sobre o objetivo do estudo assim como a importância da schistosomose e das helmintoses intestinais na saúde da população. As áreas onde decorreu o estudo estão localizadas maioritariamente em zonas rurais, sendo a agricultura e a pesca artesanal, as principais atividades de subsistência.

A seleção destas áreas de estudo, por indicação do MINSA, deve-se ao conhecimento prévio sobre a elevada prevalência de schistosomose e helmintoses intestinais na população escolar (MINSA, 2005), e à não existência de dados posteriores sobre a situação epidemiológica. Para além disso e de acordo com os dados regionais, a taxa de analfabetismo nesta população continua a ser elevada e a maioria reside em áreas com condições de extrema pobreza, com deficientes condições de saneamento básico.

### 3.3 - Colheita e preparação de amostras biológicas (urina, fezes e sangue)

A colheita de amostras biológicas, urina, fezes e sangue, foi feita durante o pré e pós-tratamento com PZQ, em utentes do INSP, Cacuaco, Quela e escola primária de Malange e Humpata. As amostras foram identificadas conforme a ordem de obtenção das

mesmas, com número e nome do paciente. A referida colheita de material biológico ocorreu no período entre as 10 e as 14 horas. Após a colheita os recipientes com os produtos biológicos foram armazenados em caixas térmicas. Procedeu-se à preparação das amostras, no laboratório do respetivo hospital ou centro de saúde, consoante a análise a efetuar, nomeadamente:

- a) Uma amostra de fezes e de urina sem conservante para análise de PCR de acordo com Gomes *et al.*, (2006), conservadas a -20°C.
- b) Uma amostra de fezes e de urina, conservadas em formol a 10% para os exames parasitológicos, para detecção de ovos nas fezes e na urina.

### **Conservação das amostras biológicas**

Todos os produtos recolhidos foram conservados em frigorífico a -20°C. O transporte das amostras (fezes, urina e sangue) foi realizado em caixas térmicas, contendo gelo para o laboratório do INSP, em Luanda. As amostras para análise posterior no IHMT, foram preparadas de sedimentos obtidos após concentração de fezes e de urina (2 alíquotas para cada amostra, uma com Etanol 70° e outra com Trizol) e conservadas a -80°C até ao seu transporte.

### **3.4 – Pesquisa de ovos de *Schistosoma haematobium* e detecção de hematúria**

A cada indivíduo foi distribuído um recipiente descartável, com capacidade de 80 ml (*Diag Testi*®), previamente identificado com os seus dados pessoais, no qual se recolhiam 25 ml de urina da micção efetuada no período da manhã (das 10 às 14 horas).

As amostras de urina colhidas, uma por utente, foram centrifugadas (Figura 17) e o depósito foi conservado e posteriormente observado, analisado para a detecção de ovos de *Schistosoma haematobium*, pelo método de filtração (Mott, 1988 e WHO, 1991), (Anexo 2.3). A intensidade da infeção (carga parasitária) foi expressa em número de ovos de *S. haematobium* por 10 ml de urina e classificada em leve (1-10 ovos/10 ml), moderada (11-49 ovos/10 ml) e pesada ( $\geq 50$  ovos /10 ml).

Após as análises parasitológicas, o sedimento urinário foi dividido em duas alíquotas, numa das quais se adicionou Trizol (para posterior análise molecular) e noutra formol a 10% (para confirmação do diagnóstico parasitológico, se necessário). A presença de hematúria foi efetuada imediatamente após a colheita, utilizando tiras reativas

(Test UX®), (Figura 18).



Figura 17 - Kit para Filtração de Urina para pesquisa de *S. haematobium*  
(Foto I. Jeremias 2016)

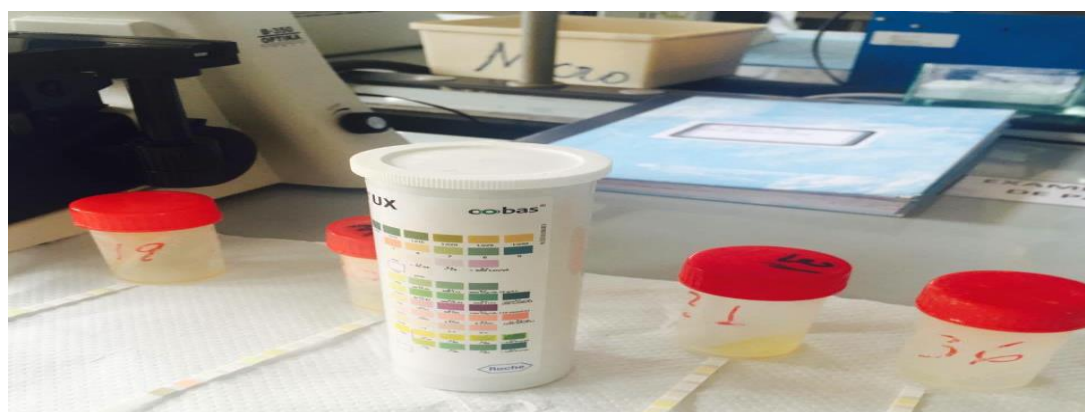


Figura 18 - Fitas reativas para a detecção de hematúria, (Test UX®) (Foto I. Jeremias)

### 3.5 - Colheita e processamento das amostras de fezes

Cada participante recebeu um frasco rotulado com o número, nome e data para a colheita de fezes, com a explicação verbal dos procedimentos da colheita de fezes. Os produtos recolhidos foram examinados pelos métodos de Kato-Katz e de Telemann-Lima (Figuras 19 e 20) para a detecção de ovos de *S. mansoni* e de helmintas intestinais (Anexos 2.1 e 2.2). A quantificação da carga parasitária foi expressa em número de ovos por grama

de fezes (OPG), sendo a classificação do grau de parasitismo leve, moderado e pesado, de acordo com o *cut-off* definido para cada espécie de helminta (WHO, 2004). A amostra restante foi centrifugada com água destilada e o sedimento preparado com Trizol e Etanol 70° (2 alíquotas por sedimento) e conservado (-80°C) para posterior análise molecular.



Figura 19 – Método de Kato-Katz (Foto I. Jeremias)



Figura 20 - Método de Telemann-Lima (Foto I. jeremias)

### **3.6 - Método molecular**

#### **3.6.1- Extração de DNA para detecção de *S. haematobium* e *S. mansoni***

A fase de extração de DNA nas amostras de urina e fezes foi realizada com base no protocolo de CTAB proposto por Stothard & Rollinson (1996), e pelo método de Trizol (Invitrogen) com ligeiras modificações (Anexos 3.1 e 3.2).

#### **3.6.2 Extração e precipitação de DNA de fezes e urina conservadas em Trizol (Invitrogen)**

Com a finalidade de proceder a extração de RNA para análise de RT-PCR (PCR em Tempo Real) e garantir maior reprodutividade da técnica, as amostras de urina e fezes foram conservadas em Trizol (Invitrogen) até se efetuar a extração de DNA pelo método tradicional, utilizando o mesmo reagente, de acordo com protocolo e recomendações do fabricante, com pequenas modificações. Deste modo, inicialmente colocaram-se 300 µl de amostra do sedimento contendo ovos de *S. haematobium* (urina) ou de sedimento contendo ovos de *S. mansoni* (fezes) em *ependorf*, seguido de homogeneização com 1 ml de Trizol.

A este material contendo ovos de *Schistosoma* macerados, adicionaram-se cerca de 300 µl de Etanol a 100%, seguido de agitação por inversão durante 2 minutos (min). Seguidamente deixou-se a amostra repousar à temperatura ambiente (T. A.) por 2 a 3 minutos com posterior centrifugação a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se com 1ml de citrato de sódio e deixou-se repousar por 30 min à T.A., repetindo-se a operação anterior. Em seguida a amostra foi lavada com 2 ml de Etanol a 70% e após um período de repouso de 10 a 20 minutos à T. A. e centrifugação (2000 rpm durante 5 min a 4°C), retirou-se o sobrenadante, colocou-se em tubo aberto a 60° C (15 min) e adicionaram-se 50 µl de tampão TE (10mM Tris, 1 mM EDTA pH 8), conservando-se a -80°C até a sua utilização.

#### **3.6.3 - Extração de DNA de fezes e urina pelo método de CTAB (Tampão Brometo de hexadeciltrimetilamônio), descrito por Stothard & Rollinson (1996) com ligeiras modificações.**

De acordo com o protocolo, colocaram-se inicialmente 600 µl de tampão CTAB (2 M Tris acetato 0,05 EDTA, pH=8,3) previamente aquecido na estufa a 56,5°C durante 10 minutos, num tubo de *eppendorf*, ao qual foi adicionado um volume de 10 µl de proteinase K para desproteinização da amostra. Juntou-se uma alíquota de 300 µl, previamente preparada, do sedimento positivo para *S. haematobium* ou para *S. mansoni*.

Após homogeneização, a mistura foi incubada em estufa a 55°C, durante 90 min com agitação regular de 15 em 15 minutos. Posteriormente, adicionou-se à mistura 600 µl de Clorofórmio:Isoamyl (24:1) previamente aquecido a 56,5°C na estufa, durante 10 minutos, e agitou-se a mistura por inversão durante 2 minutos. Seguidamente foi submetida à centrifugação rápida separando-se a parte orgânica da fase aquosa.

Colocaram-se 800 µl de Etanol gelado em novos tubos de *eppendorf*, transferiu-se o sobrenadante para estes tubos e descartando-se o tubo contendo o filtrado da centrifugação. A amostra foi submetida a centrifugação de 13000 rpm durante 20 minutos e, após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se a lavagem do *pellet* adicionando 500 µl de Etanol a 70%, seguido de nova centrifugação de 13000 rpm durante 15 minutos. Após descartar o sobrenadante total, a amostra foi deixada em repouso por 5 minutos à Temperatura Ambiente (T.A) para melhor concentração do DNA. O *pellet* foi seco a 55°C (15 min) e o DNA foi ressuspendido em 50 µl de água destilada.

#### **3.6.4 - Quantificação e pureza do DNA**

A quantificação e a pureza do DNA extraído foram avaliados com recurso ao NanoDrop ND-1000 Espectrómetro (NanoDrop Technologies, USA), e as amostras foram armazenadas a -80°C, até utilização.

#### **3.6.5 - Análise molecular**

A análise molecular das amostras obtidas foi realizada na UEI de Parasitologia Médica/ Helminologia e Malacologia Médicas, IHMT.

#### **PCR convencional**

Foi utilizada a técnica de PCR convencional (Hamburger *et al*, 2001). Esta técnica é indicada para o diagnóstico de *Schistosoma* spp. e outros microrganismos em situações

especiais onde a alta sensibilidade e especificidade são requeridas (Rabello *et al*, 2002). No caso de *S. mansoni* a técnica de PCR foi realizada utilizando o *primer* específico *SmPF* (*forward*), com a seguinte sequência, (5´GATCTGAATCCGACCAACCG3´) e o *Primer SmPR* (*reverse*), correspondente à seguinte sequência (5´ATATTAACGCCCACGCTCTC 3´). A amplificação de *S. mansoni* ocorreu a 110 *pb* (Hamburger *et al*, 2001) - Tabela 4. Para *S. haematobium* foi utilizado o *primer ShDra1F* (*forward*) com a seguinte sequência, (5´GATCTCACCTATCAGACGAAAC3´) e o *primer ShDra1R* (*reverse*), correspondente a seguinte sequência, 5´TCACAACGATACGACCAAC 3´. A amplificação de *S. haematobium* ocorreu no fragmento de 121 *pb* (Lodh *et al*, 2014) - Tabela 1.

Tabela 1- *Primers* específicos utilizados na PCR convencional para detecção de *S. haematobium* e respectivas sequências (Hamburger *et al*, 2001 e Lodh *et al*, 2014).

<i>Primers</i>	Sequências	Size
<i>SmPF</i>	5´- GATCTGAATCCGACCAACCG – 3´	110 <i>pb</i>
<i>SmPR</i>	5´- ATATTAACGCCCACGCTCTC – 3´	110 <i>pb</i>
<i>ShDra1F</i>	5´- GATCTCACCTATCAGACGAAAC– 3´	121 <i>pb</i>
<i>ShDra1R</i>	5´-TCACAACGATACGACCAAC – 3´	121 <i>pb</i>

## Otimização

A otimização da técnica foi realizada com uma temperatura de hibridização, o número de ciclos e a quantidade de enzima correspondente à reação de amplificação com 10 amostras que também foram utilizadas na reação normal da PCR. Como controles positivos, utilizou-se DNA de verme adulto de *S. mansoni* e, para *S. haematobium*, DNA do parasita gentilmente cedido por BEI Resources (NR-31682, BEI Resources, USA). Após a visualização de bandas nítidas (Figura 21), o protocolo foi considerado otimizado.





Figura 21 - Gel de eletroforese a 2% de otimização da PCR, para detecção de DNA de *S. haematobium*, na faixa dos 121 pb em 12 amostras (de 45 a 59) parasitologicamente positivas e duas amostras (419 e 422) que serviram como controlo (CP+) e a amostra (NT) corresponde ao controlo negativo (amostra sem DNA), *Primer ShDra1F/R* e o marcador molecular de 100 pb.

### 3.6.6 - Reação de PCR convencional

#### 3.6.6.1 - Detecção de DNA de *S. haematobium* pela PCR

Para a detecção de DNA recorreu-se à reação descrita por Lodh *et al.* (2014), para *S. haematobium*, que consistiu em uma MIX, em tubos de PCR, para um volume final de 25 µl [10 µl de tampão (1x *Green GoTaq® Flexi Buffer*, Promega), 6 µM de *MgCl<sub>2</sub>*, Promega, 3 µl (1,2 µM de *DnTP* Promega, *Primer Forward* 0,5 µl (0,5 µM Promega), *Primer Reverse* 0,5 µl (0,5 µM Promega), 0,5 µl (5U *GoTaq® DNA Polymerase*, Promega)] e cerca de 1 µl de DNA *template* (5-10 ng/µl) sendo o volume final completado com água ultrapura. O programa de amplificação para detecção de *S. haematobium*, teve início com um ciclo de desnaturação a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 33 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, *hibridização* a 53 °C durante 90 segundos e 72 °C durante 1 minuto e finalizando com uma extensão de 5 minutos a 60 °C.

#### 3.6.6.2 - Detecção de DNA de *S. mansoni* pela PCR

Efetuuou-se a reação de amplificação descrita por Hamburger *et al.* (2001), que consistiu em uma mistura, em tubos de PCR, para um volume final de 25 µl dos seguintes reagentes: 10 µl (1x *Green GoTaq® Flexi Buffer*, Promega), 6 µl (6 µM de *MgCl<sub>2</sub>*,



Promega), 3 µl (1,2 µM de *DnTP* Promega) *Primer Forward* 0,5 µl (0,5 µM Promega), *Primer Reverse* 0,5 µl (0,5 µM Promega), 0,5 µl (5U *GoTaq® DNA Polymerase*, Promega) e cerca de 1 µl (5 -10 ng/µl) de DNA *template* sendo o volume final completado com água ultrapura. A reação teve início com um ciclo de desnaturação a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, *hibridização* a 60°C durante 90 segundos e a 72°C durante 30 segundos, finalizando com uma extensão de 5 minutos a 72°C. Esta amplificação foi realizada em termociclador *GnBh Mechatronic Systems*.

## Visualização

Os produtos amplificados da PCR (10 µl) em Tampão TAE 1X (2M Tris-Acetato, 0,05 M EDTA, pH 8,3) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% corado com 10 µl de Brometo de Etídio (para cada 100 ml de gel), a 100 V durante 1 hora, com marcador de 100 pb (*Hypperladder II Biotline*), posteriormente visualizados sob UV em transluminador (*Alphamager® HP, Alpha Innotech*) e fotografados.

## 3.7 - Análise por RAPD-PCR

### 3.7.1 - Método de RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA fragments*).

#### 3.7.1.1 - Extração DNA genómico

Para a extração do DNA genómico, foram selecionada, aleatoriamente, amostras positivas de urina e de fezes de indivíduos parasitados oriundos das províncias de Luanda e Malange. Os ovos foram concentrados pelas técnicas de concentração usando solução salina durante várias vezes até ficarem limpos.

A metodologia usada na extração de DNA foi similar à descrita previamente (3.6.1), com algumas modificações (volume de reagentes, tempo de incubação). Resumidamente, os ovos de *S. haematobium* foram colocados em diferentes tubos de 1,5 ml com 650 µl de tampão CTAB (2 M tris acetato 0,05 EDTA, pH=8,3) aquecido ao qual se adicionaram 10 µl de Proteinase K e procedeu-se à maceração dos ovos. De seguida colocaram-se os tubos na estufa durante 90 minutos, a 65°C. No final deste tempo, foram

adicionados 650 µl de Clorofórmio-Isoamyl (24:1), agitou-se por inversão durante dois minutos e centrifugou-se a 13000 rpm (23000 rcf) por alguns segundos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 750 µl de etanol absoluto gelado para que se desse a precipitação do ADN e em seguida centrifugou-se durante 20 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi rejeitado e o *pellet* foi lavado com 500 µl de etanol a 70% e centrifugado de novo, nas mesmas condições. Por fim, rejeitou-se o sobrenadante e o *pellet* obtido foi ressuspensionado em 50 µl de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH=8). A quantificação do ADN foi determinada recorrendo ao espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (V3.7.1) e guardado a -20°C, até ser utilizado.

### 3.7.1.2 - Amplificação de RAPD-PCR

Foram selecionados cinco *primers* aleatórios (Tabela 2) para a amplificação do ADN pela técnica de RAPD-PCR, descritos por Barral *et al.*, (1993) e Shalaby *et al.*, (2011) e sequências iniciadoras (Gasmelseed *et al.*, 2014).

Tabela 2- Marcadores RAPD utilizados (*Eurofins MWG Operon*), e respetivas sequências de nucleótidos.

<i>Primers</i>	Sequência 5' → 3'
<i>Primer I</i> (A01)	CAG GCC CTT C
<i>Primer II</i> (A02)	TGC CGA GCT G
<i>Primer III</i> (A12)	TCG GCG ATA G
<i>Primer IV</i> (A13)	CAG CAC CCA C
<i>Primer VI</i> (Y20)	AGC CGT GGA A

### 3.7.1.3 - Reação de RAPD-PCR

A amplificação foi realizada segundo a metodologia descrita por Williams *et al.*, (1990) e Shalaby *et al.*, (2011). A mistura de reação foi feita para um volume final de 25 µl, contendo uma concentração final de 3 µl (1x *Green GoTaq® Flexi Buffer*, Promega), 2 µl (2,5mM) de MgCl<sub>2</sub>, (Promega), 2 µl (0,2 mM) de cada dNTP, (Promega), 1,5 µl (0,15 mM) dos *primers*, 0,5 µl (1U de *GoTaq® DNA Polymerase*, Promega) e cerca de 2 µl

(concentração de 5-10 ng/μl de ADN de cada amostra a testar), sendo o volume final completado com água ultrapura.

A amplificação foi realizada em termociclador (AVISO®, GmBH Mechatronic Systems), com as seguintes condições: período de desnaturação de 5 minutos a 92°C, seguindo-se 35 ciclos, com 1 minuto de desnaturação a 92°C cada, 4 minutos de hibridização a 34°C e 2 minutos de extensão a 72°C. Terminados os 35 ciclos foi realizada uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

#### 3.7.1.4 - Gel de agarose a 2%

Após amplificação os fragmentos de ADN (10 μl) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose em Tampão a 1,5% TAE 1X (2M Tris-Acetato 00,5 mM EDTA 1mM, pH 8,3) onde foi incorporado Brometo de Etídio (0,5 μg/ml). Juntamente com os produtos amplificados utilizou-se um marcador de massa molecular “HypperLadder II” (Bioline) de 2000 pares de bases. A migração ocorreu a 100

V durante 2h30m e os fragmentos de ADN foram visualizados num transluminador (Alphamager® HP, Alpha Innotech) e fotografados com luz ultravioleta (UV). A reação de PCR foi realizada de acordo com a descrita por Shalaby *et al.*, (2011).

#### 3.7.1.5 - Análise dos perfis electroforéticos

Na análise da variabilidade genética foi construída uma matriz de dados binários para os fragmentos polimórficos amplificados onde foi atribuído o valor (1) para a presença e (0) para a ausência de bandas. As bandas visíveis foram consideradas enquanto as de difícil resolução foram excluídas da análise. A similaridade entre as amostras das duas províncias, Luanda e Malange, foi calculada através do Coeficiente de Similaridade (S) (*Dice's coeficiente*), de acordo com a seguinte formula:  $S = 2a / 2a + b + c$ , em que *a* corresponde ao número de bandas partilhadas pelas amostras da mesma espécie (*S. haematobium* ou *S. mansoni*) das duas províncias, Luanda e Malange.

#### 3.7.1.6 - Otimização de RAPD-PCR.

Foi realizada a otimização da técnica de RAPD-PCR, com uma temperatura de hibridização, o número de ciclos e a quantidade de enzima correspondente à reação de

amplificação, com 8 amostras que também foram utilizadas na reação normal da PCR. Foi utilizado o controlo positivo do verme adulto de *S. mansoni* diluído a 1:10 e, para *S. haematobium*, foi utilizada a amostra NR-31682 (BEI Resources, USA). Após a visualização de bandas nítidas, o protocolo foi considerado otimizado (Figura 22).

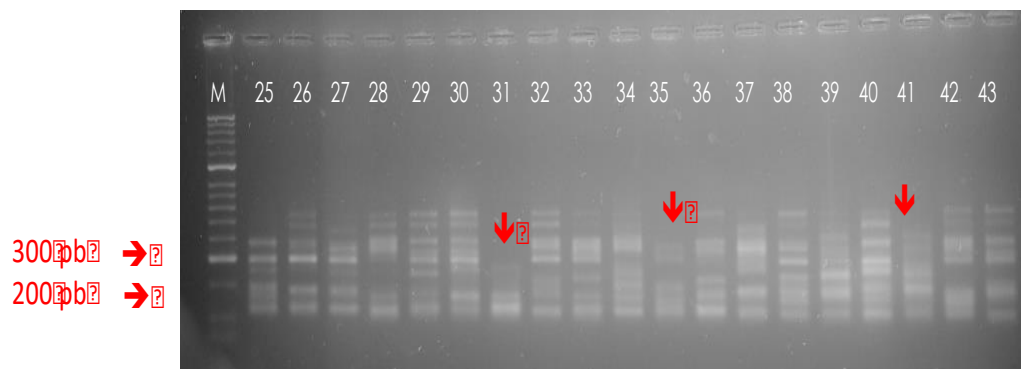


Figura 22 – Imagem ilustrativa do gel de eletroforese 2% da otimização do RAPD-PCR e amplificação de DNA dos ovos de *S. haematobium* e perfis encontrados das amostras de Malange, usando o *Primer* (A02) e marcador de 2000 pb.

### 3.8 - Estudo populacional através da análise dos microsatélites

A amplificação das regiões dos microsatélites foi efetuada selecionando 7 pares de *loci*. As sequências dos *primers* e as respectivas temperaturas de hibridação encontram-se descritas nas Tabelas 4 e 13. Em cada reação de PCR foi utilizada uma mistura com 7 pares de *primers*, correspondentes a 14 *loci*, foram amplificados os fragmentos de DNA de ovos de *S. mansoni* e *S. haematobium*. O volume das sequências utilizadas para cada reação foi de 1µl de DNA (concentração entre 2 a 4 ng).

Para a amplificação das regiões dos microsatélites, recorreu-se a conjuntos de *primers* *Reverse* (R) e *Foward* (F). Os *loci* foram marcados por fluorescência utilizando 6-FAM do corante (azul), VIC (verde), NED (amarelo) e PET (vermelho). As sequências dos *primers* e as temperaturas de hibridação encontram-se descritas nas Tabelas 4 e 8.

Assim, para determinar a eficácia do protocolo de extração de DNA (CTAB), utilizado para todas as amostras genotipadas, utilizaram-se sete marcadores correspondentes a 14 *loci* dos microssatélites previamente caracterizados em uma única reação de PCR multiplex de acordo com o descrito por Huyse *et al.*, (2008). Para *S. haematobium* os *loci* selecionados foram: C102, C131, C111, D3, C11, C116, C146 (Blair *et al.*, 2001 e Gower *et al.*, 2011) - Tabela 3, nas condições de preparação especificadas na Tabela 4.

### 3.8.1 - *Schistosoma haematobium*

Para *S. haematobium* foram utilizados os seguintes *primers*, com as respectivas sequências e tamanhos (Tabela 3).

Tabela 3 - Microssatélites: *Primers* (*S. haematobium*), respectivas sequências e marcadores (Blair *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2001 e Gower *et al.*, 2007)

Locus	Fluorocromo	Tamanho Amplicão	Sequência <i>Primer</i>	TH (°C)
C102-F	6-FAM	168-206	F- TGTCTCTGTTGAATGACCGAAT R-TTAGATGAATAATAATGTTGAAACCAC	51°C
C131-F	PET	240-296	F-CTTGTCATTTGGGCATTGTG R-CATGGTGAGGTTCAAACGTG	51°C
C111-F	NED	108-234	F-CCCTTGTCTTCAATGCGTTA R-GAACGTCTAACTGGCGATCA	51°C
D3-F	VIC	217-226	F-TTCGATCTGCACTATGAAGGAC R-TGCAAGCGAGAAGTAATCAGG	51°C
C11-F	6-FAM	84-126	F-GGAGCGTAAAAGTAAAACAAGAACA R- GCACCTTTCCGTTTCCTCT	51°C
C116-F	6-FAM	263-425	F-TCGAAAAATAAAGATACACAGAGTGG R-AGGGTGCCCTCAAATCTCT	51°C
C146-F	PET	138-186	F-AAGCATCAGAAATGACAAATCG R-TTGAATTCACAGGAGGCAAC	51°C

### 3.8.1.1 - Multiplex com 7 loci

Tabela 4 - Preparação de 10x *Primer mix* (contendo 2  $\mu\text{M}$  de cada *Primer*)

Concentração do *Primer stock*: 100  $\mu\text{M}$  (100  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ )

C102_F	1 $\mu\text{l}$
C102_R	1 $\mu\text{l}$
C131_F	1 $\mu\text{l}$
C131_R	1 $\mu\text{l}$
C111_F	1 $\mu\text{l}$
C111_R	1 $\mu\text{l}$
D3_F	1 $\mu\text{l}$
D3_R	1 $\mu\text{l}$
C11_F	1 $\mu\text{l}$
C11_R	1 $\mu\text{l}$
C116_F	1 $\mu\text{l}$
C116_R	1 $\mu\text{l}$
C146_F	1 $\mu\text{l}$
C146_R	1 $\mu\text{l}$
TE buffer ou $\text{H}_2\text{O}$	36 $\mu\text{l}$
Total volume	50 $\mu\text{l}$

### 3.8.1.2- Amplificação da PCR de *S. haematobium*

A amplificação da PCR, foi realizada com 10  $\mu\text{l}$  do produto da PCR da reação com 1  $\mu\text{l}$  de DNA *template* (concentração de 10  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ), 12,5  $\mu\text{l}$  (1,6  $\mu\text{M}$ ) de 2x QIAGEN Multiplex PCR, Master Mix (HotStarTaq DNA Polimerase, Multiplex PCR Buffer e dNTP Mix), 2,5  $\mu\text{l}$  (0,02  $\mu\text{M}$ ) de Primer 10x Primer mix (ml) L46951 (20  $\mu\text{M}$ ) e (0,04  $\mu\text{l}$ ) de cada Primer, 9  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada ultrapura para completar o volume final da reação (Tabela 5). As condições de amplificação encontram-se descritas nas Tabela 6 (a-c).

Tabela 5- Mix do Multiplex - PCR

1-Reativação da Mix para o Multiplex PCR	Por Tubo	Total
Número de PCR-Tubos	1	
Total Volume per PCR-Tubo ( $\mu\text{l}$ )	25	
Template DNA (added later) ( $\mu\text{l}$ )	1	
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix ( $\mu\text{l}$ )	12,5	12,5
10x primer mix ( $\mu\text{l}$ )	2,5	2,5
Água destilada ( $\mu\text{l}$ )	9	9
Volume Total ( $\mu\text{l}$ )		24
Volume por tubo ( $\mu\text{l}$ )	24	

### 3.8.1.3 - Perfil da PCR-multiplex de *S. haematobium*

Tabelas 6 abc) - Condições de amplificação de ciclos de *S. haematobium*

a)

Desnaturação e HotStarTaq DNA Ativação da Polimerase	15 min a 95°C
Numero de ciclos	<b>40 CICLOS</b>
Desnaturação	30'' a 94°C
<b>Hibridização</b>	<b>90'' a T°C</b>
<b>Extensão</b>	60'' a 72°C
Extensão Final	30 min 60°C

b)

<b>Hibridização I</b>	<b>1° 20 CICLOS</b>
Numero de ciclos	<b>2 ciclos x 10 temperaturas</b>
Desnaturação	30'' a 94°C
<b>Hibridização</b>	<b>90'' a 60°C- 51°C</b>
<b>Extensão</b>	60'' a 72°C
Extensão Final	30 min 60°C

c)

<b>Hibridização II</b>	<b>2° 20 CICLOS</b>
Numero de ciclos	<b>20 ciclos</b>
Desnaturação	30'' a 94°C
<b>Hibridização</b>	<b>90'' a 50°C</b>
<b>Extensão</b>	60'' a 72°C
Extensão Final	30 min 60°C

### 3.8.2 - *Schistosoma mansoni*

Para *S. mansoni*, foram selecionados os seguintes *loci*: SMDA28, SMD28, CA11-1, SMS9-1, SMD25, SMD89 e SMU31768 (Durand *et al.*, 2000; Blair *et al.*, 2001; Curtis *et al.*, 2001; Gower *et al.*, 2007), com as respectivas sequências e tamanhos - Tabela 7.

Tabela 7- Microssatélites: *primers* de *S. mansoni*, respectivas sequências e marcadores (Blair *et al.*, (2001; Curtis *et al.*, 2001 e Gower *et al.*, 2007)

Locus	Fluorocromo	Tamanho Amplicação	Sequência <i>Primer</i>	TH (°C)
SMDA28	FAM	92-128	F-CATGATCTTAGCTCAGAGAGCC R-AGCCAGTATAGCGTTGATCATC	48°C
CA11-1	PET	191-231	F-TTCAAACCATGAGCAATAGATAC R-CAACAAACAAGAAGGCTGATTAG	48°C
SMD28	NED	230-245	F-CATCACCATCAATCACTC R- R-TATTCACAGTAGTAGGCG	48°C
SMU31768	VIC	179-247	F-TACAACCTCCATCACTTC R-CCATAAGAAAGAAACCAC	48°C
SMD25	FAM	272-312	F-GATTCCCAAGATTAATGCC R-GCCATTAGATAATGTACGTG	48°C
SMS9-1	FAM	178-208	F-ATTACGATTGCACAGATACTTTTG R-TTTCAGAAATTTGTTTCCTCCTC	48°C
SMD89	PET	138-169	F-AGACTACTTTCATAGCCC R-TTAAACCGAAGCGAGAAG	48°C

#### 3.8.2.1 - Amplificação da reação de *S. mansoni*

Foi efetuada a amplificação da PCR, utilizando a Mix contendo, 10 µl do produto da PCR da reação com 1 µl de DNA template (concentração de 10 ng/µl), 12,5 µl (1,6 µM) de 2x QIAGEN Multiplex PCR, Master Mix (HotStarTaq DNA Polimerase, Multiplex PCR Buffer e dNTP Mix), 2,5 µl (0,02 µM) de Primer 10x Primer mix (ml) L46951 (20 µM) e (0,04 µl) de cada Primer, 9 µl de H<sub>2</sub>O destilada ultrapura para completar o volume final da reação de acordo com a Tabela 8.

A amplificação da PCR das duas espécies nomeadamente *S. mansoni* e *S. haematobium*, foi efetuada no termociclador *GnBh Mechatronic Systems* usando as condições referidas anteriormente, de acordo com as Tabelas 6 a) b) c) e 10 a) b) c).



Tabela 8 - Mix do Multiplex – PCR para *S. mansoni*

<b>1-Reativação Mix para o Multiplex PCR</b>	<b>Por Tubo</b>	<b>Total</b>
Número de PCR-Tubos	1	
Total Volume per PCR-Tubo (µl)	25	
Template DNA (added later) (µl)	1	
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (µl)	12,5	12,5
10x primer mix (µl)	2,5	2,5
Água destilada (µl)	9	9
Volume Total (µl)		24
Volume por tubo (µl)	24	

### 3.8.2.2 - Multiplex com 7 Loci

Tabela 9 - Preparação de 10x primer mix (contendo 2 µM de cada *primer*). Concentração do *primer* stock: 100 µM (100 pmol/µl)

SMDA28_F	1 µl
SMDA28_R	1 µl
SMD25_F	1 µl
SMD25_R	1 µl
SMD28_F	1 µl
SMD28_R	1 µl
SMD89_F	1 µl
SMD89_R	1 µl
SMU31768_F	1 µl
SMU31768_R	1 µl
CA11-1_F	1 µl
CA11-1_R	1 µl
SMS9-1_F	1 µl
SMS9-1_R	1 µl
TE buffer ou H2O	36µl
Total volume	50µl

### 3.8.2.3 - Condições da reação do ciclo de *S. mansoni*

Tabela 10 abc) – Condições de amplificação do ciclo de *S. mansoni*

a)

Desnaturação e HotStarTaq DNA Ativação Polimerase	15 min a 95°C
Numero de ciclos	<b>40 CICLOS</b>
Desnaturação	30'' a 94°C
<b>Hibridização</b>	<b>90'' a 58°C- 48°C</b>
Extensão	60'' a 72°C
Extensão Final	30 min 60°C

b)

<b>Hibridização I</b>	<b>1° 20 CICLOS</b>
Numero de ciclos	<b>2 ciclos x 10 temperaturas</b>
Desnaturação	30'' a 94°C
<b>Hibridização</b>	<b>90'' a 58°C- 48°C</b>
Extensão	60'' a 72°C
Extensão Final	30 min 60°C

c)

<b>Hibridização II</b>	<b>2° 20 CICLOS</b>
Numero de ciclos	<b>20 ciclos</b>
Desnaturação	30'' a 94°C
<b>Hibridização</b>	<b>90'' a 48°C</b>
Extensão	60'' a 72°C
Extensão Final	30 min 60°C

### Otimização

A otimização da técnica foi realizada com uma temperatura de hibridização, o número de ciclos e a quantidade de enzima correspondente à reação de amplificação com 11 amostras que também foram utilizadas na reação normal da PCR (Figura 23). Foram utilizados os controles positivos de *S. mansoni* e de *S. haematobium* referidos anteriormente.

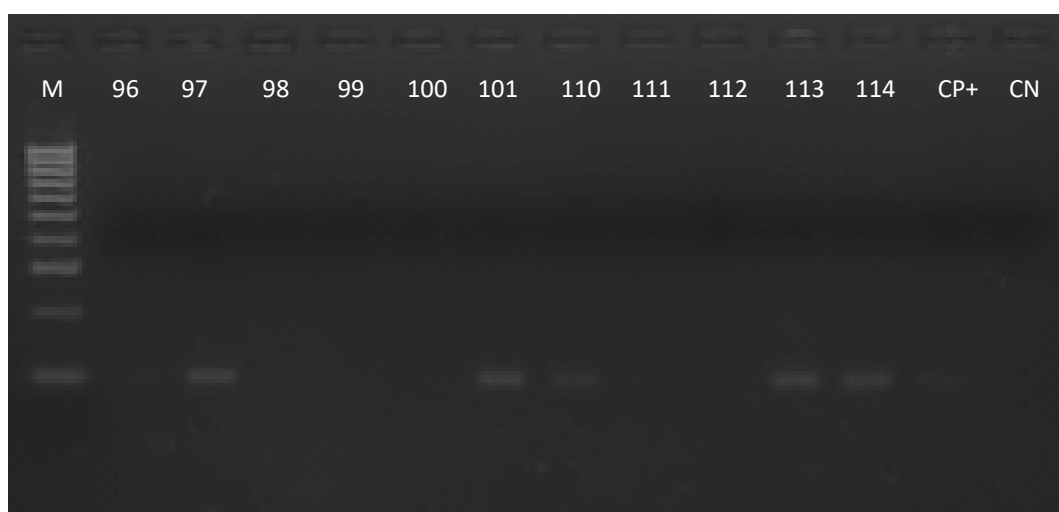


Figura 23 - Imagem representativa do gel de electroforese 2%, para otimização da técnica dos microssatélites, Loci 4, T° 48°C, DNA de 11 amostras positivas parasitologicamente para *S. mansoni* (96-114), controles positivo (CP+) e negativo (CN)

### Visualização

Os produtos de PCR amplificados (10 µl) foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TAE e corados com de Brometo de Etídio (10 mg/µl) para cada 100 ml de gel, e submetidos a 130 V durante 30 minutos; posteriormente foram visualizados sob UV no transluminador e fotografados. Após a confirmação de que as bandas obtidas eram as esperadas e ter-se verificado a ausência de bandas inespecíficas (o que pressupõe a boa qualidade do DNA, dos *primers* e do programa utilizado), seguiu-se a fase da análise dos fragmentos.

### 3.8.3 - Análise dos fragmentos e genotipagem

Com objetivo de avaliar a eventual variabilidade genética intrapopulacional das duas espécies (*S. mansoni* e *S. haematobium*) entre as províncias estudadas, realizou-se a fase de genotipagem que consistiu na diluição de 4 µl (0,16 µM) do produto da PCR multiplex, adicionada à mistura 10 µl de N-Dimetil HiDi Formamide® (ABI #4311320) Nk com GeneScan<sup>1-</sup> 500 (ROX 500) sendo o tamanho do padrão analisado em sequenciador automático ABI 377 e GeneScan V 3.7 (PE Applied Biosystems). Os tamanhos dos alelos foram calculados utilizando o ABI PRISM GeneScan V 2.7 e software Genotyper V 2.7 (Applied Biosystems) em 96 poços da placa de PCR previamente fechada, centrifugada e posteriormente analisada pelo *Size standard LIZ500® standard* (ABI #402985). Para cada espécie a diversidade genética foi examinada através do cálculo do número de alelos, usando a análise de rarefação da heterozigosidade esperada (diversidade genética) (He) e a heterozigosidade observada (Ho) usando o software 6.5 GenAlEx.

### 3.9 – Análise estatística

Para analisar as variáveis do estudo recorreu-se ao software estatístico, IBM SPSS Statistics (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 24 para Microsoft Windows. Para comparação dos vários parâmetros entre os grupos diferentes, aplicou-se o teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) na avaliação da frequência e diferenças de parasitismo entre os grupos da população. Quando os valores esperados eram inferiores a 5, utilizou-se o teste de Fisher em alternativa ao teste de ( $\chi^2$ ). Na comparação das medianas das variáveis quantitativas entre grupos independentes (por exemplo, na comparação da intensidade do parasitismo entre os grupos populacionais - género, grupo etário aplicaram-se os testes não paramétricos de Mann-Whitney-Wilcoxon ou de Kruskal-Wallis. O coeficiente de *Kappa* foi aplicado para avaliar o grau de concordância entre as técnicas parasitológicas e a PCR.

Para analisar a associação existente entre diferentes parâmetros recorreu-se ao coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância foi de 5%.

### 3.10 - Considerações Éticas

O estudo teve a aprovação da Comissão de Ética do Ministério da Saúde de Angola, Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola (Anexo 1) e do Conselho Científico do Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Portugal.

O consentimento prévio dos adultos e dos pais ou encarregados de educações dos menores para participação voluntária no estudo foi obtido após a leitura e explicação dos objetivos e procedimentos do estudo (Anexo 1). Os dados dos participantes foram codificados e analisados de forma anónima de modo a garantir a sua confidencialidade. O tratamento foi efetuado a todos os indivíduos (crianças e adultos) parasitados por *S. haematobium* e/ou *S. mansoni* (com PZQ, 40 mg/kg) e/ou helmintas intestinais (Albendazol, 400 mg/kg), de acordo com as recomendações (WHO, 2006). O tratamento adicional com Sulfato Ferroso foi efetuado de acordo com o grau de anemia.

Os procedimentos terapêuticos estiveram a cargo das equipas técnicas das Direções Provinciais de Saúde e da ONG CONSAÚDE em Malange, província onde foi efetuado o controlo pós-tratamento após quatro meses. Os casos em que os valores hematológicos (hemoglobina e hematócrito, principalmente) estavam manifestamente abaixo do normal, indicadores de anemia grave, foram encaminhados para o respetivo hospital ou centro de saúde onde efetuaram o tratamento com Sulfato Ferroso.

## **4. Resultados**

## 4. Resultados

Os resultados apresentados neste capítulo estão subdivididos de acordo com as metodologias utilizadas na avaliação da prevalência da schistosomose urogenital e intestinal e análise genética dos seus agentes etiológicos. Apresentamos o perfil sociodemográfico da população analisada em quatro províncias e a sua relação com a infecção por *S. haematobium* e *S. mansoni*, assim como a sua associação ao estado hematológico. Descrevemos as diferenças genéticas encontradas nos isolados destas duas espécies nas áreas geográficas estudadas.

### 4.1- Caracterização e distribuição da população analisada

#### 4.1.1 - Perfil sociodemográfico dos participantes no estudo

O estudo foi realizado em 366 indivíduos, residentes nas províncias de Luanda, Bengo, Malange e Huíla (Tabela 11) sendo 187 do sexo feminino e 179 do sexo masculino, com idades compreendidas entre os dois e os 75 anos (média 18,5 anos ( $\pm$  12,2 DP). A maioria residia na província de Malange (39,9%), seguida da Huíla (29,9%), Luanda (24,9%) e Bengo (6,3%). Os grupos etários maioritários correspondiam a crianças e jovens com idade inferior aos 20 anos (67,7%), sendo os restantes (32,3%) com idade superior. Em concordância com a idade, os estudantes constituíam o maior grupo analisado (62%), seguido dos agricultores e comerciantes (13,7% e 12,6%, respetivamente).

Quanto ao local de residência, a maioria dos participantes residia em comunidades rurais (57,9%) e em bairros suburbanos (37,2%); apenas 18 (4,9%) moravam em área urbana. De um modo geral, as condições de saneamento básico e, em particular, de água canalizada nas respetivas habitações eram bastante deficientes, apenas 46 (12,6%) dispunham de água na residência, enquanto 230 (62,8%) possuíam casa de banho. A ausência destas condições essenciais foi mais acentuada nas comunidades das províncias da Huíla e Malange.

Com exceção das variáveis referentes aos grupos etários, grau de escolaridade e atividade profissional, observaram-se diferenças estatisticamente significativas ( $\chi^2$ ,  $P=000$ ) nos restantes indicadores (género, residência, condições de saneamento básico e água canalizada nas habitações)

Tabela 11 - Perfil sociodemográfico da população analisada

Indicadores	Malange		Luanda		Huíla		Bengo		Totais		P
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
<b>Género</b>											≈0,000
Masculino	105	(71,9)	44	(48,4)	21	(19,8)	9	(39,1)	179	(48,9)	
Feminino	41	(28,1)	47	(51,6)	85	(80,2)	14	(60,9)	187	(51,1)	
<b>Idade (anos)</b>											NA
≤10	63	(43,2)	37	(40,7)	3	(2,8)	8	(34,8)	111	(30,3)	
11-20	75	(51,4)	23	(25,3)	26	(24,5)	13	(56,5)	137	(37,4)	
21-30	6	(4,1)	15	(16,5)	51	(48,1)	2	(8,7)	74	(20,2)	
31-40	0	(0,0)	10	(11,0)	11	(10,4)	0	(0,0)	21	(5,7)	
≥41	2	(1,4)	6	(6,6)	15	(14,2)	0	(0,0)	23	(6,3)	
<b>Escolaridade</b>											NA
Nenhuma	41	(28,1)	2	(2,2)	30	(28,4)	1	(4,4)	74	(20,2)	
Ens. Primário	79	(54,1)	51	(56,0)	61	(57,5)	19	(82,6)	210	(57,4)	
1º ciclo	26	(17,8)	30	(33,0)	12	(11,3)	3	(3,0)	71	(19,4)	
2º ciclo	0	(0,0)	7	(7,7)	2	(1,9)	0	(0,0)	9	(2,5)	
Licenciatura	0	(0,0)	1	(1,1)	1	(0,9)	0	(0,0)	2	(0,5)	
<b>Residência</b>											≈0,000*
Urbana	0	(0,0)	17	(18,7)	1	(0,9)	0	(0,0)	18	(4,9)	
Suburbana	32	(21,9)	67	(73,6)	18	(17,0)	19	(82,6)	136	(37,2)	
Rural	114	(78,1)	7	(7,7)	87	(82,1)	4	(17,4)	212	(57,9)	
<b>Água canal.</b>											≈0,000*
Sim	4	(2,7)	33	(36,3)	2	(1,9)	7	(30,4)	46	(12,6)	
Não	145	(97,3)	58	(63,7)	104	(98,1)	16	(69,6)	320	(87,4)	
<b>Saneamento</b>											≈0,000*
Com WC	91	(62,3)	82	(90,1)	34	(32,1)	23	(100)	230	(65,8)	
Sem WC	55	(37,7)	9	(9,9)	72	(67,9)	0	(0,0)	136	(37,2)	
<b>Profissão</b>											NA
Estudante	138	(94,5)	56	(61,5)	12	(11,3)	21	(91,4)	227	(62,0)	
Agricultor	6	(4,1)	0	(0,0)	43	(40,6)	2	(8,6)	50	(13,7)	
Comerciante	0	(0,0)	25	(27,5)	20	(18,9)	0	(0,0)	46	(12,6)	
Doméstica	2	(1,4)	9	(9,9)	31	(29,2)	0	(0,0)	42	(11,5)	
Militar	0	(0,0)	2	(2,1)	0	(0,0)	0	(0,0)	2	(0,3)	

N=número; Ens.=ensino; \*Diferenças significativas; NA=não aplicável



## 4.2 – Resultados da análise parasitológica (urina e fezes)

### 4.2.1 - Prevalência de *S. haematobium* e de *S. mansoni*

A prevalência global de *S. haematobium* (Figura 24), pela técnica de filtração da urina, foi de 48,4% (177/366), tendo o intervalo de confiança (IC a 95%) variado entre 43,0%-53,2%. Em relação à carga parasitária, a maioria dos indivíduos parasitados (154; 87%) apresentava grau de parasitismo moderado (< 50 ovos/10 ml de urina) e apenas 23 (13%) tinham infecção pesada ( $\geq 50$  ovos/10 ml). A carga parasitária variou de 1 a 143 ovos/10 ml, sendo a mediana de 21,7 ovos/10 ml de urina de *S. haematobium* nos indivíduos parasitados.

Quanto ao parasitismo por *S. mansoni* (Figura 25), das 145 amostras de fezes examinadas, detetaram-se ovos do parasita em 32 (21,1%) [IC a 95% 16%-30%] e, à semelhança de *S. haematobium*, a maioria dos parasitados tinha uma carga parasitária leve/moderada (84,4%), correspondente a menos de 400 ovos por grama de fezes (opg), tendo os restantes 15,6% uma carga pesada ( $\geq 400$  opg). A mediana da carga parasitária foi de 120 opg, variando de 24 a 696 ovos/grama de fezes.

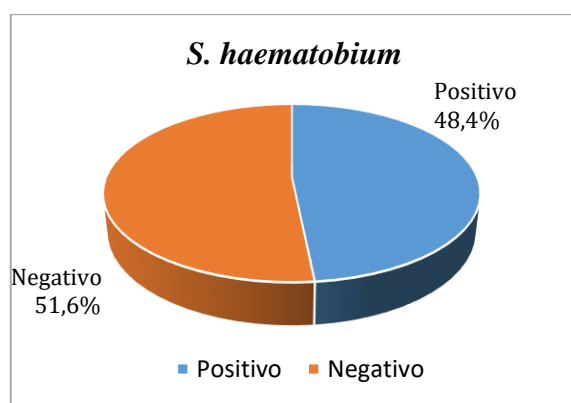


Figura 24 – Prevalência de *S. haematobium* em 366 amostras de urina

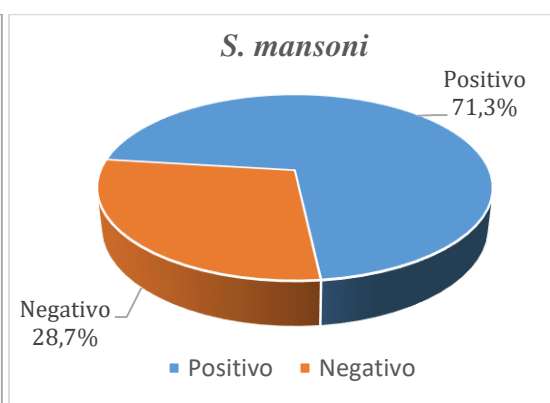


Figura 25 – Prevalência de *S. mansoni* em 145 amostras de fezes

Comparando a prevalência do parasitismo a nível regional (Figura 26), a taxa mais elevada para *S. haematobium* registou-se nos participantes da província do Bengo com 78,3% (18/23), seguida de Luanda com 63,7% (58/91), Malange com 58,9% e a menor observada na Huíla, com 14,2% (15/106). No caso de *S. mansoni*, só foram detetados

casos positivos em Malange e em Luanda, sendo a prevalência de 27,8% (30/108) e de 8,3% (2/24), respetivamente. Verificaram-se diferenças significativas inter-províncias tanto para *S. haematobium* ( $\chi^2$ ,  $P \approx 0,000$ ) como para *S. mansoni* ( $\chi^2$ ,  $P = 0,015$ ).

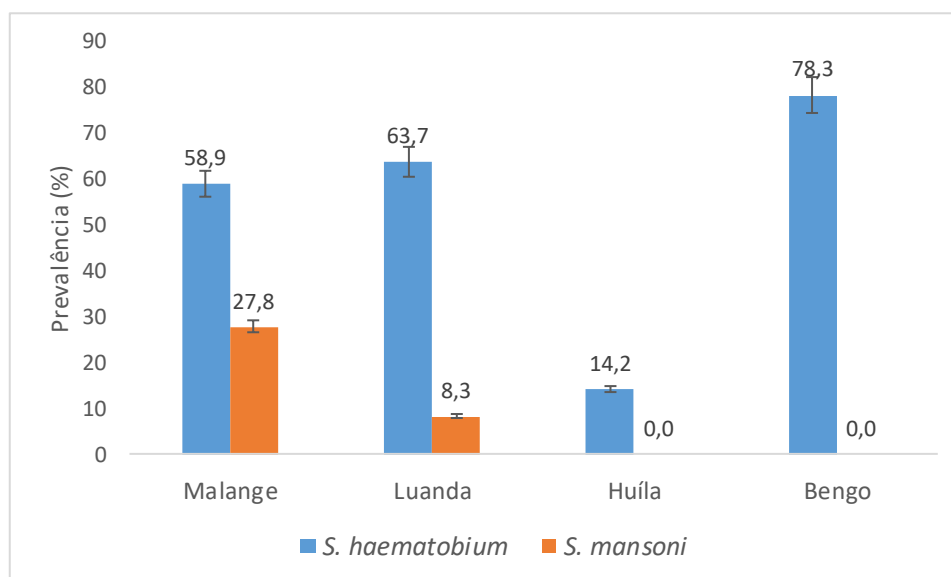


Figura 26 – Prevalência de *S. haematobium* e de *S. mansoni* nas províncias de Malange, Luanda, Huíla e Bengo. (Diferenças significativas,  $\chi^2$ ,  $P < 0,005$ )

#### 4.2.2 – Prevalência da infeção schistosómica em relação ao género

O maior número de indivíduos parasitados pelos dois agentes etiológicos de schistosomose era do género masculino (Figura 27), mas apenas no caso de infeção por *S. haematobium* se observaram diferenças com significado estatístico ( $P = 0,048$ ) em relação à população feminina. Com efeito, 96 (53,6%) dos casos positivos ocorreram no grupo masculino e 81 (45,8%) no feminino. Padrão idêntico foi observado em relação à infeção por *S. mansoni*, dos quais 20 (23,8%) eram da população masculina e 12 (19,7%) da feminina. Contudo, neste caso não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ( $P = 0,851$ ). A ocorrência de infeções moderadas e pesadas foi superior na população masculina para as duas espécies, mas sem diferenças significativas ( $P > 0,05$ ).

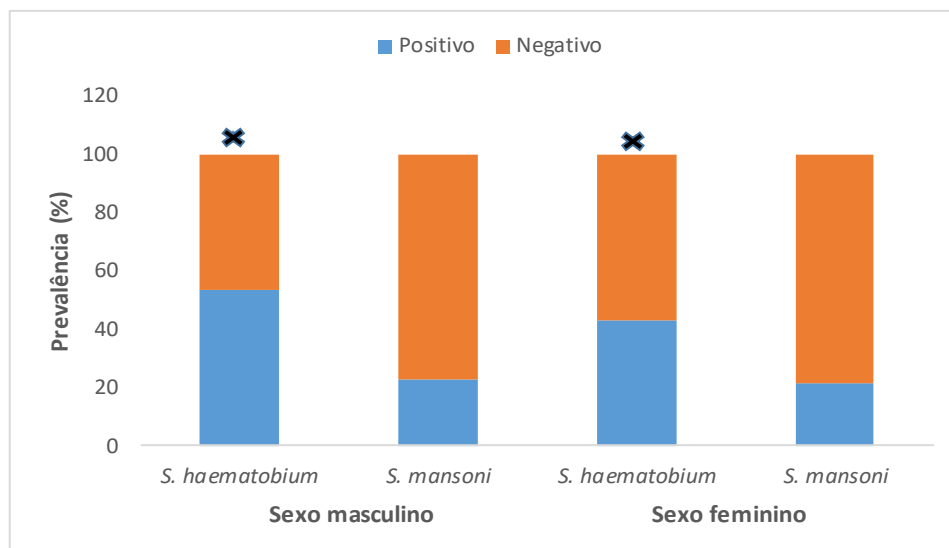


Figura 27 – Prevalência de *S. haematobium* e de *S. mansoni* em relação ao género. x – diferenças significativas ( $P=0,048$ )

#### 4.2.3 – Prevalência e intensidade do parasitismo em relação à idade

Em relação à infecção pelas duas espécies de *Schistosoma*, a prevalência foi mais elevada nos grupos jovens que, no caso de *S. haematobium* (Figura 28), incidiu nas crianças (<10 anos); por sua vez, foi também o grupo que apresentou maior número de indivíduos com infecção pesada (>50 ovos/10 ml de urina. Em relação a *S. mansoni*, tanto a prevalência como a carga parasitária (leve e moderada) foram superiores no grupo com idades compreendidas entre os 11-20 anos (Figura 29); os cinco (15,6%) casos de infecção pesada também foi observada neste grupo etário.

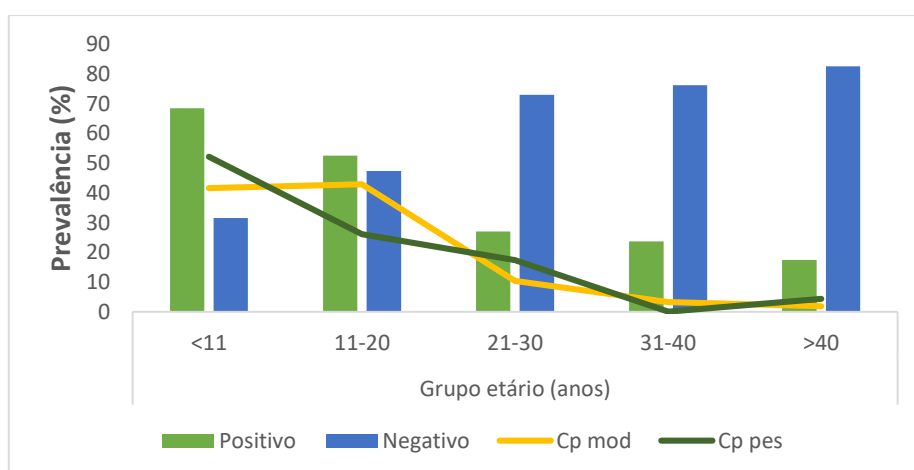


Figura 28 – Prevalência de *S. haematobium* em relação ao grupo etário  
Cp mod= carga parasitária moderada (1-50 ovos/10 ml);  
Cp pes= carga parasitária pesada (>50 ovos /10 ml)

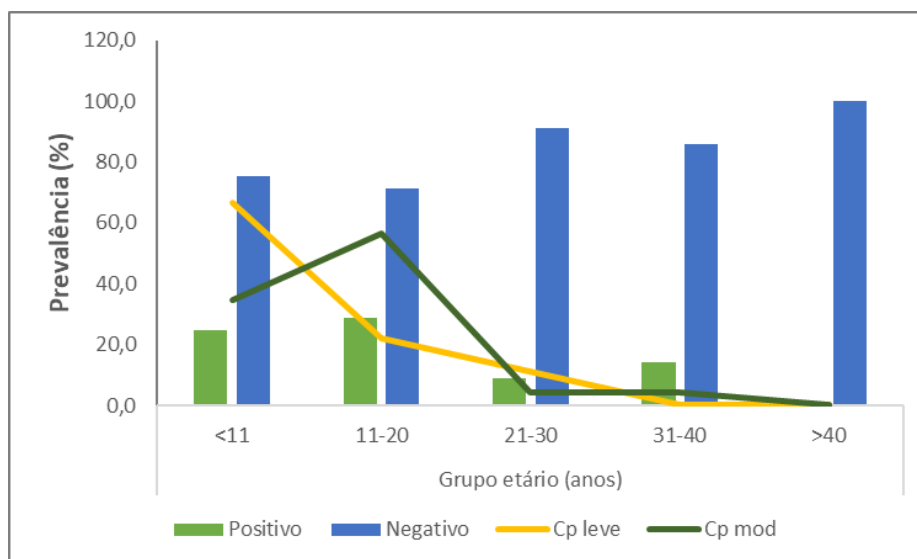


Figura 29 – Prevalência de *S. mansoni* em relação ao grupo etário

Cp leve= carga parasitária leve (1-99 ovos/g);

Cp mod= carga parasitária moderada (100-399 ovos/g)

### 4.3 – Resultados da análise molecular

#### 4.3.1 - Detecção de DNA de *S. haematobium* na urina e de *S. mansoni* nas fezes

A detecção de DNA parasitário pela técnica da PCR, utilizando os *primers* específicos, só foi possível ser efetuada em 229 amostras de urina, para diagnóstico de *S. haematobium* e em 80 amostras de fezes para *S. mansoni*.

Das 105 amostras de urina que tinham sido negativas pelo método de filtração, detetou-se DNA de *S. haematobium* em 55 (52,4%) enquanto 112 (90,3%) das 124 amostras positivas parasitologicamente confirmaram a positividade pela PCR, com a presença de bandas de peso molecular de 121 pb, características do parasita (Figura 30), sendo evidente o baixo nível de concordância entre os dois métodos ( $K=0,392$ ;  $P=0,057$ ), devido sobretudo ao resultado dos casos negativos; com efeito, apenas 50 amostras (47,6%) foram simultaneamente negativas por filtração e PCR (Tabela 12).

Em relação à detecção de hematuria por tiras reativas, o seu grau de concordância com a PCR também foi baixo (Tabela 12), apesar de ser estatisticamente significativo ( $K=0,065$ ;  $P=0,037$ ).

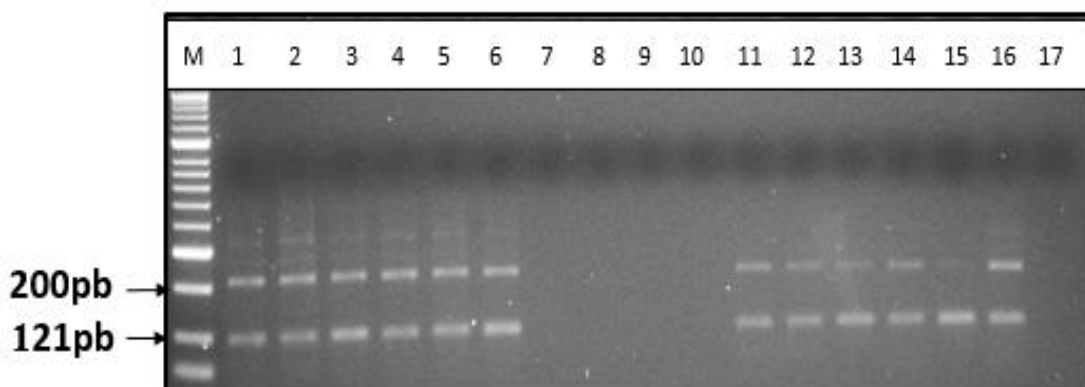


Figura 30. Detecção do DNA de *S. haematobium* na faixa dos 121pb. Amostras de 1-6: controlos positivos de carga parasitária leve (1-2), moderada (3-4) e pesada (5-6); amostras 7 e 17: controlos negativos; amostras 8-10: urina negativa (filtração e PCR) e amostras 11-16 positivas para *S. haematobium* M- Marcador molecular com 50pb.

Tabela 12 – Comparação da sensibilidade analítica das técnicas de PCR com a filtração e o teste de hematúria no diagnóstico de *S. haematobium* na urina

PCR					
Urina	Positivo	Negativo	Total	K	<i>P</i>
Filtração					
Positivo	112	12	124	0,392	0,057
Negativo	55	50	105		
Total	167	65	229		
Hematúria					
Positivo	29	4	33	0,065	0,037
Negativo	138	58	196		
Total	167	62	229		

K= coeficiente de Kappa; P - não significativo

Resultado semelhante verificou-se em relação a *S. mansoni*; das 52 amostras de fezes negativas pelo método de Kato-Katz, 22 (42,3 %) também foram negativas pela PCR e, das 28 positivas, 27 (96,4%) confirmaram ser positivas pela PCR, apresentando bandas com peso molecular de 110 pb (Figura 31) correspondente ao descrito por Lodh *et al* (2014). Os dois métodos apresentaram um baixo nível de concordância ( $K=0,313$ ;  $P=0,075$ ), em particular nos resultados das amostras negativas (Tabela 13).

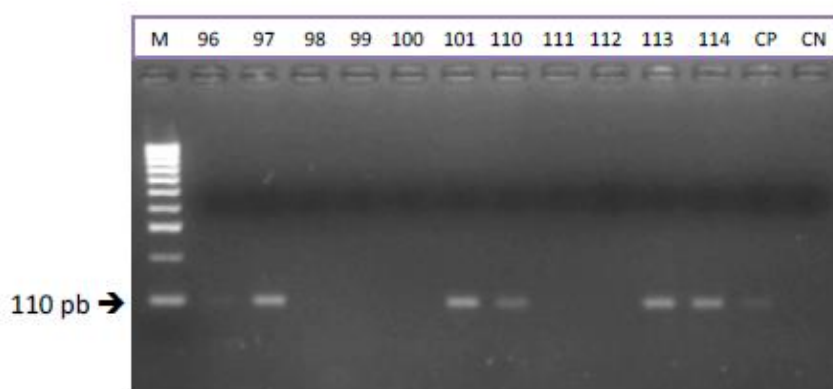


Figura 31 - Detecção de DNA de *S. mansoni* nas fezes por PCR. Amostras 96-114 negativas por Kato-Katz; CP- controlo positivo (DNA de verme adulto de *S. mansoni* diluído 1:10); CN – controlo negativo. A seta indica a banda de referência de 110 pares de bases (tamanho esperado).

Tabela 13 – Comparação da sensibilidade analítica das técnicas de Kato-Katz e da PCR no diagnóstico de *S. mansoni* nas fezes

	<i>S. mansoni</i> - Kato-Katz				
	Positivo	Negativo	Total	<i>K</i>	<i>P</i>
<b>PCR</b>					
Positivo	27	30	57	0,313	0,075
Negativo	1	22	23		
Total	28	52	80		

*K*= coeficiente de *Kappa*; *P* - não significativo

#### 4.3.2 – Coinfecção de *S. haematobium* e de *S. mansoni* pelos métodos parasitológicos e pela PCR

Dos participantes que tinham simultaneamente urina e fezes (n=145), diagnosticaram-se 18 casos de coinfecção pelos métodos parasitológicos (filtração da urina e Kato-Katz) em comparação com 27 casos detetados pela PCR, comprovando a sensibilidade superior desta técnica (Figura 32). A maioria das infeções mistas foi observada nos participantes das províncias de Malange (23) e da Huíla (4).

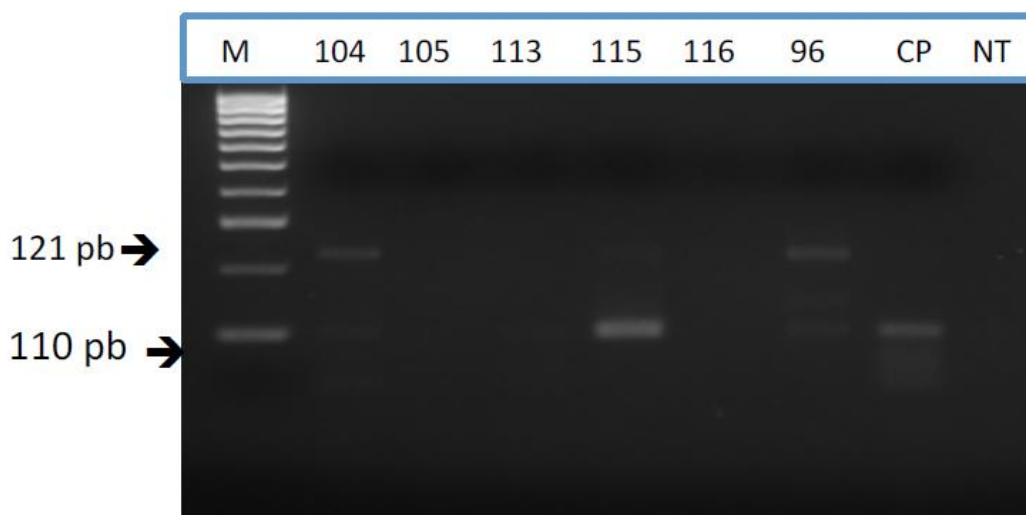


Figura 32- Análise por PCR convencional para detecção de DNA de infecções mistas por *S. haematobium* e *S. mansoni*. CPSm- controle positivo (DNA do verme de *S. mansoni* diluído 1:10); CPSH – controle positivo (DNA de *S. haematobium* BEI Resources, NR-31682). NT - controle negativo (amostra sem DNA). As setas indicam as bandas de referência de 110 pb e 121 pb. Amostras de 104-96 são positivas para *S. mansoni* e *S. haematobium*

#### 4.3.3 - Especificidade da técnica de PCR na coinfeção com outros helmintas

A presença de helmintoses intestinais concomitantes (Figura 33), em 44,8% das amostras fecais, não afetou a sensibilidade da PCR tanto para *S. haematobium* como para *S. mansoni*.

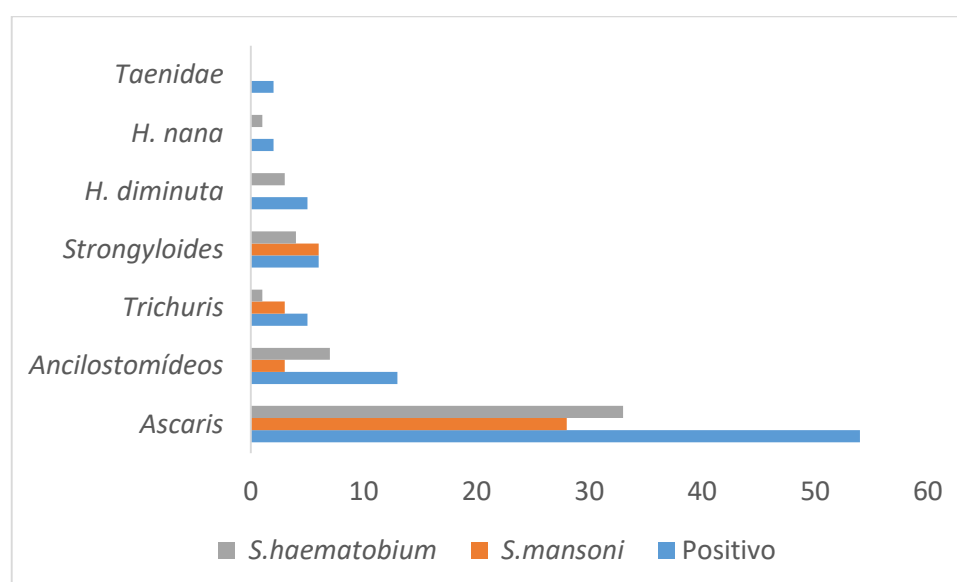


Figura 33 – Frequência de casos de *Schistosoma* em coinfeção com outros helmintas

#### 4.3.4 – Estimativa da prevalência de *S. haematobium* e de *S. mansoni* com as técnicas parasitológicas e a PCR

Comparando a prevalência estimada com base nas técnicas parasitológicas e na PCR, verificaram-se diferenças com significado estatístico ( $\chi^2$ ,  $P \approx 0,000$ ) quer para *S. haematobium* quer para *S. mansoni* (Tabela 14). O número de casos positivos das duas espécies detetado pela PCR foi praticamente o dobro, sobretudo para *S. mansoni*, do encontrado pelas técnicas parasitológicas.

Tabela 14 – Estimativa da prevalência de *S. haematobium* e de *S. mansoni*

Técnica (N)	Positivo	Prevalência	IC 95%	P
<b><i>S. haematobium</i> (229)</b>				$\approx 0,000$
Filtração	124	54,1%	0,48-0,60	
PCR	167	72,9%	0,67-0,78	
Filtração+PCR	176	76,9%	0,71-0,82	
<b><i>S. mansoni</i> (80)</b>				$\approx 0,000$
K-K	28	35,0%	0,25-0,46	
PCR	57	71,3%	0,60-0,80	
K-K+PCR	59	73,8%	0,63-0,82	

N= número de amostras; IC 95% - intervalo de confiança a 95%; K-K=Kato-Katz

#### Estimativa global da prevalência da schistosomose nas províncias associando as técnicas parasitológicas e moleculares

Considerando o número de indivíduos analisados em cada província, a prevalência estimada de schistosomose (Figura 34), conjugando os métodos parasitológicos e a PCR, não demonstra diferenças significativas ( $\chi^2$ ,  $P=0,086$ ) inter-províncias, ao contrário do observado apenas pelos métodos parasitológicos. Acresce que só com a inclusão da PCR foi possível identificar casos positivos de *S. mansoni* na província da Huíla. Face aos resultados, qualquer das regiões poderá ser classificada como hiperendémica para *S. haematobium* e mesoendémica para *S. mansoni*, de acordo com o definido pela WHO (2002) e MINSA (2005).



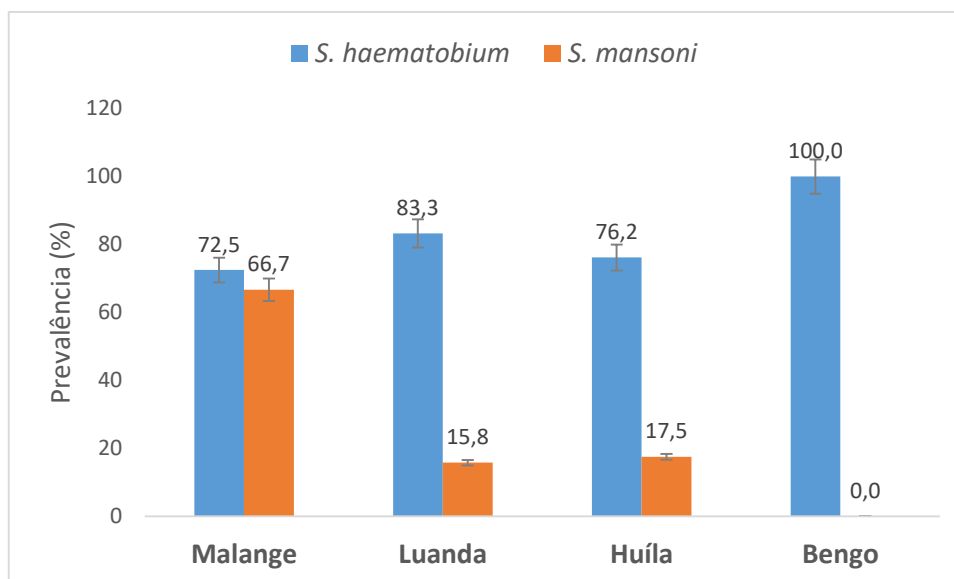


Figura 34 – Prevalência estimada das infeções por *S. haematobium* e *S. mansoni* conjugando os métodos parasitológicos e moleculares (PCR)

#### 4.3.5 – Controlo pós-terapêutico em Malange e Luanda

A avaliação da schistosomose, quatro meses após o tratamento com Praziquantel, só foi efetuada nas províncias de Malange e de Luanda, pelos métodos parasitológicos e PCR. Participaram 94 indivíduos (a maioria menores de 20 anos e do género masculino), dos quais 34 tinham sido tratados na primeira observação. Destes, 25 (73,5%) e 13 (39,3%), continuavam infetados por *S. haematobium* e *S. mansoni*, respetivamente (Tabela 15). Dos 60 que participaram exclusivamente nesta observação, 41 (68,3%) estavam infetados por *S. haematobium* e 20 (33,8%) por *S. mansoni*. Estes valores são resultantes da associação das técnicas parasitológicas e da PCR.

Tabela 15 – Controlo pós-tratamento em Malange e Luanda

	<i>S. haematobium</i>			<i>S. mansoni</i>		
	N	Positivo	(%)	N	Positivo	(%)
Pós-tt	34	25	(73,5)	33	13	(39,3)
Sem tt	60	41	(68,3)	59	20	(33,8)
Total	94	66	(73,5)	92	33	(35,8)

Pós-tt=pós-tratamento

#### 4.4 – Análise hematológica e estado parasitológico

Na análise dos indicadores hematológicos e parasitológicos, foram excluídos os participantes com hemoglobinopatias (como a drepanocitose) ou com outras infecções (exemplo: por *Plasmodium spp*).

Dos parâmetros hematológicos determinados, salientam-se os mais utilizados na avaliação da anemia: a concentração de hemoglobina (HGB) e a do hematócrito (HCT). Tanto na infecção por *S. haematobium* (Figura 35) como por *S. mansoni* (Figura 36), os indivíduos parasitados apresentavam níveis de HGB e de HCT inferiores aos não infetados (parâmetros normais), mas as diferenças só foram significativas em relação ao HCT (Teste de Mann-Whitney,  $P=0,048$ ).

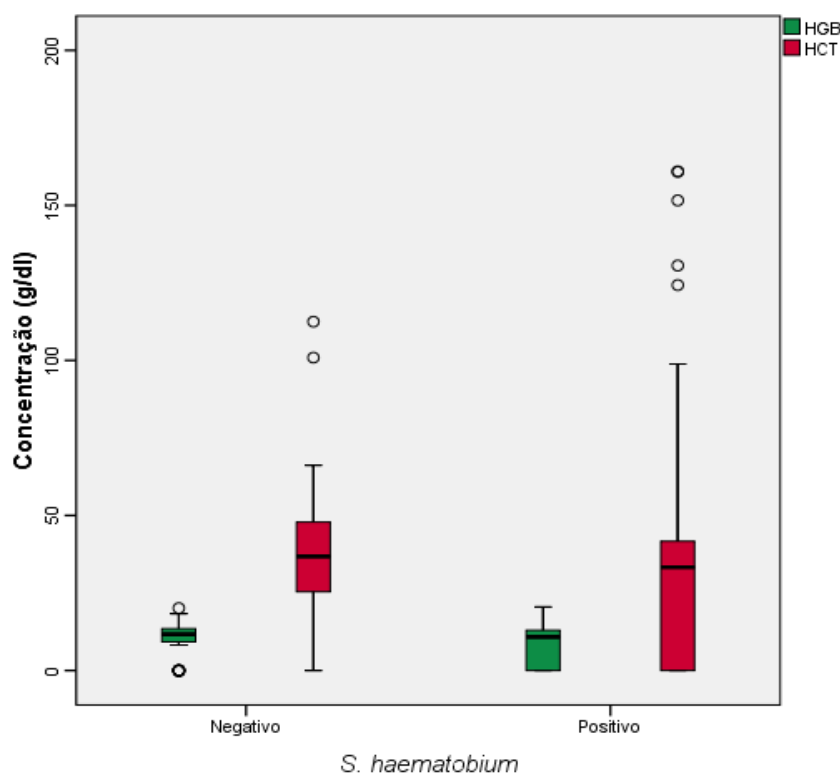


Figura 35 – Comparação dos níveis de hemoglobina e hematócrito de acordo com o parasitismo por *S. haematobium*.

HGB=hemoglobina (diferenças não significativas; Mann-Whitney,  $P=0,067$ )

HCT=hematócrito (diferenças significativas;  $P=0,048$ )

Por sua vez, a concentração destes parâmetros variou na razão inversa da carga parasitária (ao aumento da carga parasitária correspondia a diminuição da concentração), mas a correlação negativa só foi significativa para HCT na infecção por *S. mansoni* (Teste de Spearman,  $r_s = -0,258$ ;  $P = 0,025$ ).

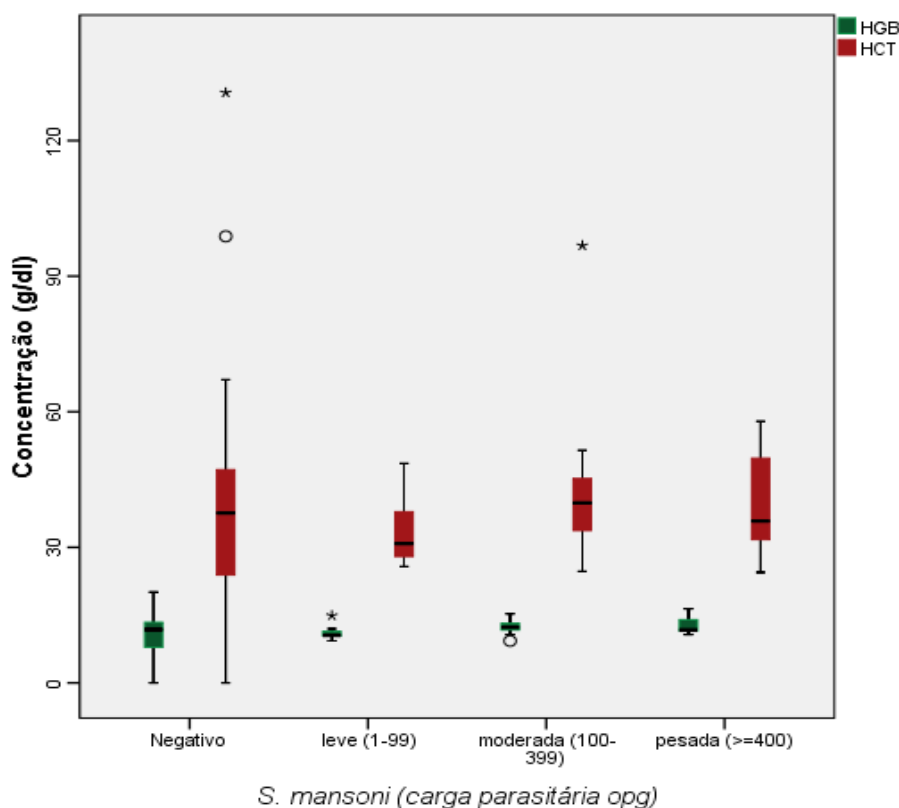


Figura 36 – Correlação dos níveis de hemoglobina (HGB) e do hematócrito (HCT) com a carga parasitária de *S. mansoni* (opg);  
HCT - correlação negativa e significativa HCT ( $r_s = -0,258$ ;  $P = 0,025$ )  
opg=nº de ovos por grama de fezes

A infecção pelas duas espécies de *Schistosoma* parece ser o co-fator agravante da anemia, uma vez que nos indivíduos apenas parasitados por geohelminths, os níveis de hemoglobina e do hematócrito não diferiam significativamente dos não parasitados (Figura 37), embora os valores fossem inferiores na presença de infecção e mais acentuados em situações de coinfeção por dois geohelminths.

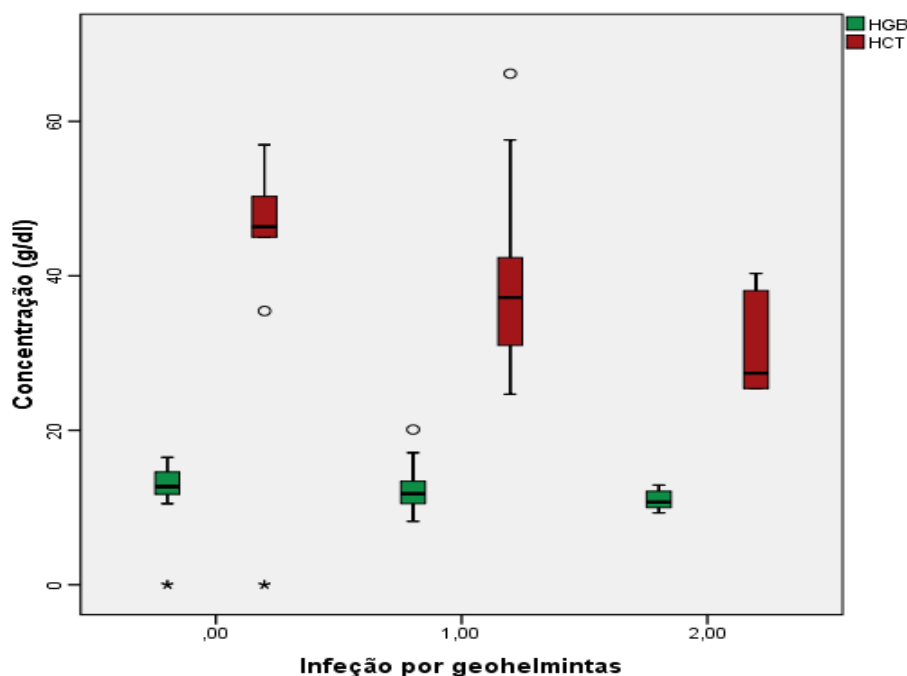


Figura 37 - 0=negativo; 1,00= monoinfeção; 2,00=coinfecção por duas espécies

HGB=hemoglobina; HCT=hematócrito (teste Kruskal-Wallis,  $P>0,05$ )

#### 4.5 – Características sociodemográficas associadas à infecção por *Schistosoma* spp.

Na análise da relação entre as condições sociodemográficas com o estado da infecção schistosômica (Tabela 16), foi evidente o maior número de infetados pelas duas espécies nos participantes mais jovens, dos primeiros anos de escolaridade (primária e 1º ciclo), residentes em zonas rurais e suburbanas e com condições precárias a nível de água canalizada nas habitações. No entanto, as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significativas.

Tabela 16 - Condições sociodemográficas associadas ao estado parasitológico

Indicadores	<i>S. haematobium</i>		<i>P</i>	<i>S. mansoni</i>		<i>P</i>
	Pos (%)	Neg (%)		Pos (%)	Neg (%)	
<b>Gênero</b>			0,383			0,104
Masculino	117 (50,6)	62 (45,9)		30 (50,0)	54 (63,5)	
Feminino	114 (49,4)	73 (54,1)		30 (50,0)	31 (36,5)	
<b>Idade</b> (anos)			0,000*			0,240
≤10	86 (37,2)	25 (18,5)		24 (40,0)	33 (38,8)	
11-20	91 (39,4)	46 (34,1)		17 (28,4)	35 (41,2)	
21-30	36 (15,6)	38 (28,1)		12 (20,0)	11 (12,9)	
31-40	7 (3,0)	14 (10,4)		5 (8,3)	2 (2,4)	
≥41	11 (4,8)	12 (8,9)		2 (3,3)	4 (4,7)	
<b>Escolaridade</b>			0,005*			0,418
Nenhuma	43 (18,6)	31 (23,0)		19 (31,7)	23 (27,1)	
Prim+1ºciclo	145 (62,8)	65 (48,1)		31 (51,7)	40 (47,1)	
>=2º ciclo	43 (18,6)	39 (28,9)		10 (16,6)	22 (25,8)	
<b>Residência</b>			0,001*			0,388
Urbana	5 (2,2)	13 (9,6)		4 (6,6)	4 (4,7)	
Suburbana	96 (41,6)	40 (29,6)		13 (21,7)	27 (31,8)	
Rural	130 (56,2)	82 (60,8)		43 (71,7)	54 (63,5)	
<b>Água canal.</b>			0,506			0,661
Com	27 (11,7)	19 (14,1)		7 (11,7)	8 (9,4)	
Sem	204 (88,3)	116 (85,9)		53 (88,3)	77 (90,6)	
<b>Saneamento</b>			0,390			0,199
Com WC	149 (64,5)	81 (60,0)		31 (51,7)	53 (62,4)	
Sem WC	82 (35,5)	54 (40,0)		29 (48,3)	32 (37,6)	
<b>Profissão</b>			0,000*			0,347
Estudante	170 (73,6)	57 (42,2)		39 (65,0)	65 (76,5)	
Agricultor	20 (8,7)	30 (22,2)		5 (8,3)	5 (5,9)	
Comerciante	18 (7,7)	29 (21,4)		9 (15,0)	11 (12,9)	
Doméstica	23 (10,0)	19 (14,2)		7 (11,7)	4 (4,7)	

Água canal.=água canalizada; Prim=primária; Pos=positivo; Neg=negativo;

\*Diferenças significativas

#### 4.6 – Análise da variabilidade genética de isolados de *S. haematobium* e de *S. mansoni*

##### 4.6.1 – Análise genética por RAPD-PCR

##### 4.6.1.1 - Análise dos fragmentos obtidos

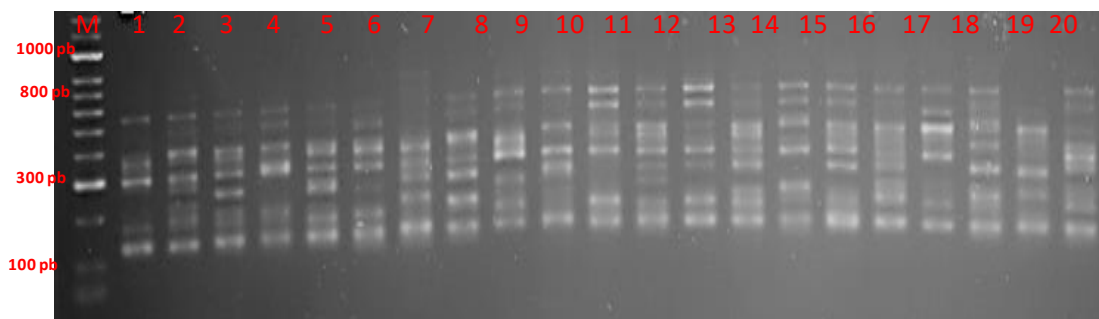
Na análise genética das populações de *S. mansoni* e *S. haematobium* em estudo, efetuou-se a comparação dos fragmentos amplificados obtidos pelos *primers* com médio e alto nível de amplificação e que apresentaram um perfil diferente dos outros. As amostras de ovos de *S. mansoni* e *S. haematobium* foram obtidas de fezes e urina, respetivamente, da população afetada das províncias de Luanda e Malange. Neste estudo apenas foram analisados os perfis electroforéticos de dois dos cinco *primers*, nomeadamente, os *primers* **A01** e **A02**. Os restantes três foram excluídos por não apresentarem um padrão passível de comparação.

Os resultados apresentados comparam as amostras positivas para *S. haematobium* e *S. mansoni* em Malange. A comparação inter-regional foi efetuada apenas com as amostras positivas de *S. haematobium* das províncias de Luanda e de Malange. Assim, analisando os resultados para a província de Malange, observou-se que com o *primer* **A01**, foi gerado um total de 20 bandas polimórficas (38,5%) e com *primer* **A02**, 14 bandas (27%) do número total de bandas polimórficas obtidas (n=52) (Tabela 17). Para a província de Luanda 11 (21%) foram polimórficas para o *primer* **A01** e 7 (13,5%) para o *primer* **A02**.

Tabela 17 - Número de bandas polimórficas encontradas para as amostras de *S. haematobium* e *S. mansoni* aplicando os *primers* A01, A02

		<b>Primer A01</b>	<b>Primer A02</b>	<b>Total</b>
Malange	<i>S. haematobium</i>	11	8	<b>19</b>
	<i>S. mansoni</i>	9	6	<b>15</b>
Luanda	<i>S. haematobium</i>	11	7	<b>18</b>
	<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>21</b>	<b>52</b>

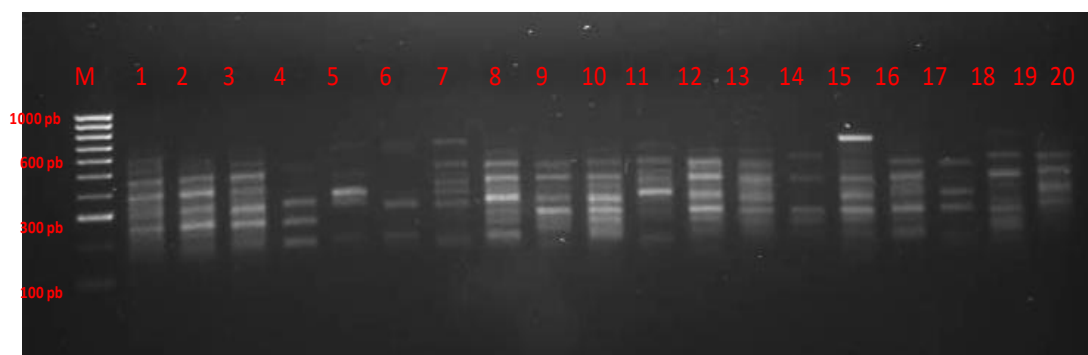
Os fragmentos gerados variaram entre os 100 e 800 pares de base para o *primer A01* e entre os 100 e 600 pares de bases para o *primer A02* (Figuras 38 a 41).



**Figura 38** – Gel de agarose a 1,5% usando o *primer A01* para as amostras de *S. haematobium* da província de Malange



**Figura 39** – Gel de agarose a 1,5% usando o *primer A02* para as amostras de *S. haematobium* da província de Malange



**Figura 40** - Gel de agarose a 1,5% usando o *primer A01* para as amostras de *S. haematobium* da província de Luanda.



Figura 41 - Gel de agarose a 1,5% usando o *primer A02* para as amostras de *S. haematobium* da província de Luanda.

A identificação das bandas polimórficas foi realizada na comparação de padrões de bandas para o mesmo gel, apenas para as amostras de *S. haematobium* das províncias de Luanda e Malange que foram detetadas em todas as amostras. Não foi possível a obtenção de resultados para *S. mansoni* para a província de Luanda.

#### 4.6.1.2 - Coeficiente de Similaridade (*S*)

Após a observação das diferenças polimórficas foi calculado o Coeficiente de Similaridade (*Dice's Coefficient*) apenas para *S. haematobium* das duas províncias em estudo, Luanda e Malange. Os resultados obtidos para *S. mansoni*, não permitiram calcular o coeficiente. Os dois *primers A01* e *A02*, apresentam um coeficiente de similaridade de 0,55 e 0,35, respetivamente (Tabela 18), sugerindo a existência de variabilidade genética entre as duas populações de *S. haematobium* das duas regiões.

Tabela 18 - Coeficiente de Similaridade de Dice (*S*) entre as populações de *S. haematobium* de e Luanda e Malange

	<i>Schistosoma haematobium</i>	
	Primer A1	Primer A2
Número de bandas partilhadas entre as amostras de Malange e Luanda	6	5
Número de bandas presentes apenas nas amostras de Luanda	4	3
Número de bandas presentes apenas nas amostras de Malange	6	6
Coeficiente de Similaridade ( <i>S</i> )	0,55	0,35



#### 4.6.1.3 - Análise da diversidade genética

As diferenças dos perfis de RAPD-PCR, entre as populações de *S. haematobium* e obtidos de diferentes indivíduos (amostras de urina) de Luanda e Malange para o *primer* A01 parecem ter produzido uma maior variabilidade genética, permitindo assim efetuar uma análise de distância das populações em questão. No que respeita à diversidade genética intrapopulacional observámos que a amostra M37 (Malange) é bastante diferente das restantes, geneticamente mais próxima das de Luanda (Figura 42).

A árvore de diversidade genética foi construída usando o programa *Maximum Parsimony* (PHYLIP).

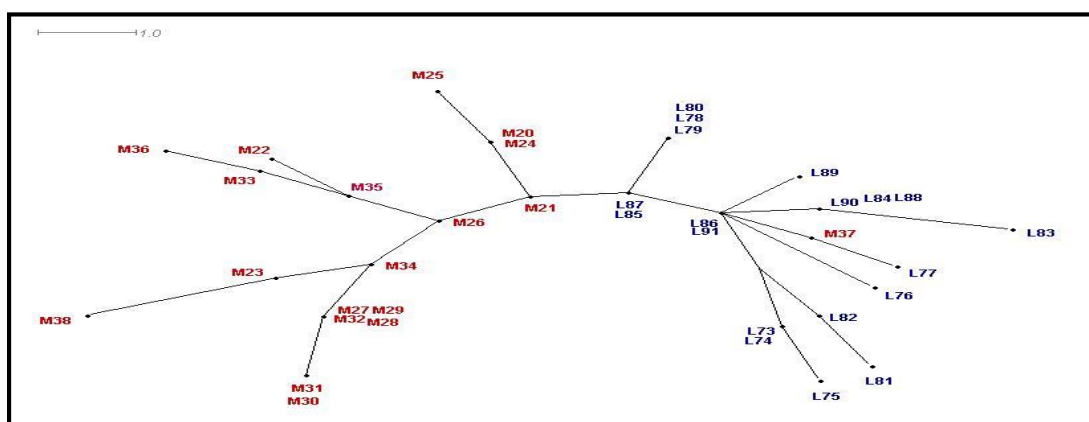


Figura 42 – Diversidade genética entre as populações de *S. haematobium* de Luanda e Malange aplicando o programa PHYLIP e o método de *Maximum Parsimony*

#### 4.6.2 – Análise genética por microssatélites

A análise molecular dos microssatélites para *S. mansoni*, foi efetuada em 40 amostras de fezes positivas, conservadas em etanol, tendo cada amostra sido amplificada para sete fragmentos de DNA microssatélites nuclear (SMD25, SMD89, SMDA28, SMU31768, SMD28, CA11-1, SMS9-1) e, para *S. haematobium*, em amostras de DNA extraídas de filtrado de urinas conservadas em etanol, de 87 doentes infectados, em que cada amostra foi também amplificada para sete fragmentos de DNA de microssatélites nuclear (C102, C131, C111, C11, C146, D3 e C116), pela técnica de PCR descrita anteriormente (3.8.1); os pares de *primers* de microssatélite foram marcados utilizando

marcadores fluorescentes 6-FAM, PET, NED e VIC. No presente estudo analisamos, no total, 14 marcadores de microssatélites, no entanto apenas dois para *S. mansoni* e dois para *S. heamatobium* produziram amplificação de DNA, facto que condicionou os resultados pouco consistentes da análise de rarefação da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e a heterozigosidade observada ( $H_o$ ), quer da comparação da mesma amostra para os diferentes marcadores quer das diversas amostras “regionais” para os vários marcadores, limitando a obtenção de resultados mais robustos de diferenciação genética comparativa, obtidos pela técnica de RAPD-PCR.

## **5. Discussão**

## 5. Discussão

Atendendo à ampla distribuição de *S. haematobium* e consequente patologia urogenital assim como a sua coendemicidade com *S. mansoni*, responsável pela forma intestinal da schistosomose, em algumas províncias do país, torna-se premente o seu controlo, com vista à redução da morbilidade causada pela parasitose para níveis que deixem de constituir um problema de saúde pública, meta preconizada pela OMS no plano estratégico de 2012 a 2020 (WHO, 2013a).

O programa de controlo da schistosomose em Angola foi reiniciado em 2005, após ter sido interrompido durante cerca de 30 anos, tendo como alvo a população escolar infantil (5-14 anos); nesse inquérito, demonstrou-se a contínua endemicidade das duas espécies, com prevalências de infeção de 40,6% para *S. haematobium* e de 4,5% para *S. mansoni*, nas crianças examinadas (MINSa, 2005). Acresce que taxas de infeção similares foram encontradas também na população juvenil e adulta em alguns estudos posteriores, sobretudo nas regiões do centro e norte, demonstrando a transversalidade da parasitose a todos os grupos etários (Figueiredo, 2008; Sousa-Figueiredo *et al.*, 2012).

A eficácia das medidas de controlo, nomeadamente o tratamento em massa ou seletivo com praziquantel (PZQ), depende não só da correta identificação dos indivíduos infetados e a sua monitorização regular bem como das medidas complementares que tenham sido implementadas, como distribuição de água tratada, melhoria de saneamento básico e educação para a saúde, condições fundamentais para reduzir o contacto da população com cursos de água e a contaminação destes com os excreta humanos (WHO, 2002; Grimes *et al.*, 2014).

No entanto, verifica-se que o tratamento e a sua avaliação em Angola não têm sido efetuados no país com a regularidade recomendada pela WHO (2002), facto que promove a recorrência da parasitose com taxas idênticas à fase pré-controlo, tal como observado por Sousa-Figueiredo *et al.* (2012) e Bocanegra *et al.* (2015) no país, assim como em diversas áreas de endemia (Satayathum *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2006). A inclusão de medidas adicionais, concretamente a nível do diagnóstico, poderá fornecer uma estimativa mais concreta da situação epidemiológica para uma abordagem de controlo mais eficaz.

Os métodos parasitológicos qualitativos e quantitativos como o de Kato-Katz para a schistosomose intestinal e a filtração da urina para a forma urogenital, são os mais aplicados nos estudos epidemiológicos da schistosomose, permitindo estimar a prevalência e a intensidade do parasitismo, indicadores relevantes para a estratégia de tratamento anual ou bi-anual das crianças em idade escolar (WHO, 1998; 2006b). Contudo, em indivíduos com baixa carga parasitária e/ou em regiões endêmicas sob controlo terapêutico periódico, os métodos parasitológicos apresentam baixa sensibilidade, o que tem consequências diretas sobre os indivíduos infetados (não são tratados) assim como sobre a situação da schistosomose, subestimando a prevalência real (Engels *et al*, 1997, 2002; WHO, 2008).

De acordo com Terer *et al*, (2013), a ausência de um teste de diagnóstico sensível e eficaz para o diagnóstico de infeções assintomáticas, não é possível realizar-se uma estimativa precisa da prevalência da doença. As técnicas moleculares baseadas na deteção de DNA das espécies de *Schistosoma* nos excreta têm revelado maior sensibilidade, sendo um complemento útil nestas situações (Pontes *et al*, 2003; Gomes *et al.*, 2010; Enk *et al*, 2012; Ibironke *et al.*, 2012; Lodh *et al*, 2014; Hessler *et al*, 2017 )

Os resultados do presente estudo estão em concordância com os dos autores referidos. Com efeito, com a utilização dos métodos parasitológicos nos 366 indivíduos das quatro províncias alvo (Luanda, Bengo, Malange e Huíla) obtiveram-se prevalências de 48,4% (177/366) para *S. haematobium* e 22,1% (32/145) para *S. mansoni* (Figuras 24 e 25), significativamente inferiores ( $P \approx 0,000$ ) às obtidos pela técnica da PCR, com 72,9% e 71,3% para *S. haematobium* e *S. mansoni*, respetivamente (Tabela 14). A deteção de DNA parasitário em amostras de urina e fezes parasitologicamente negativas, demonstrou a elevada sensibilidade da PCR, confirmada pela presença de bandas de peso molecular de 121 pb (*S. haematobium*) e de 110 pb (*S. mansoni*) específicas dos parasitas (Figuras 30 e 31).

De acordo com Oliveira *et al*, (2007) e Ibironke *et al*, (2011), a presença de outras bandas, como se detetou também neste estudo (200 pb) pode ocorrer devido à elevada quantidade de oligonucleótidos livres, complementares de uma sequência repetitiva de DNA.

Estes resultados confirmam os que foram previamente encontrados por Jeremias

*et al.* (2015), num estudo realizado em Angola em que num total de 142 amostras de urina não foram encontrados ovos de *S. haematobium* pelos métodos parasitológicos mas o método de PCR revelou a presença de DNA do parasita em 105 amostras de urina.

Na análise comparativa da sensibilidade analítica entre os métodos parasitológicos e a PCR (Tabelas 12 e 13), verificou-se uma baixa concordância quer com a filtração da urina ( $Kappa=0,392$ ) quer com a técnica de Kato-Katz ( $Kappa=0,313$ ), embora com algum significado estatístico ( $P=0,057$ ) no caso de *S. haematobium*. De acordo com Pontes *et al.*, (2003) os casos positivos por métodos parasitológicos e não detetados pela PCR convencional, devem-se a vários factores como a inibição de amplificação do DNA devido a compostos fecais, degradação do DNA da urina ou de fezes após a colheita no campo ou durante o transporte para o laboratório, o acondicionamento ou mesmo a ausência de ovos no material biológico analisado.

Um dos dados mais relevantes com a aplicação da técnica da PCR foi a deteção do 10 casos de parasitismo por *S. mansoni* nos participantes da Huíla, enquanto que nenhum caso foi detetado pelo Kato-Katz.

À semelhança do observado por Lodh *et al* (2014) no Gana e Hessler *et al* (2017) na Zâmbia, também constatamos a superioridade analítica da PCR na co-infecção pelas duas espécies, com 27 casos detetados em comparação com 18 identificados pelos métodos diretos. Os indivíduos infetados simultaneamente pelas duas espécies eram sobretudo das regiões do Planalto Central, Malange e Huíla. De igual modo, a especificidade da PCR no diagnóstico da infeção schistosómica manteve-se elevada na presença de parasitismo concomitante por geohelminthas (Figura 33).

Conjugando os resultados dos dois métodos (parasitológicos e PCR) e de acordo com a classificação estabelecida pela WHO (2002), a situação da schistosoma por *S. haematobium* nas quatro províncias é considerada hiperendémica (prevalência  $\geq 50\%$ ), enquanto para *S. mansoni* as regiões de Luanda e Huíla podem ser consideradas mesoendémicas (prevalência  $\geq 10\%$  e  $< 50\%$ ). A situação na província de Malange é a mais preocupante atendendo à hiperendemicidade encontrada para as duas espécies de *Schistosoma* (Figura 34). Acresce que no controlo realizado quatro meses após a terapêutica (possível apenas em Luanda e Malange), dos 64 indivíduos tratados, 38

continuavam infetados (Tabela 15). Uma vez mais, a associação dos métodos parasitológicos e a PCR forneceu indicadores mais precisos na avaliação após o tratamento.

Uma das principais dificuldades na monitorização dos programas de controlo em massa reside no seguimento dos indivíduos tratados e, deste modo, poder avaliar-se a eficácia da terapêutica a nível individual e o seu impacto a nível global. Possivelmente a inclusão de metodologias mais sensíveis e simples de executar pelos técnicos dos centros de saúde regionais, permitirão efetuar o *follow-up* periódico e tratar seletivamente os indivíduos infetados, contribuindo para a redução da morbilidade e transmissão dos parasitas a nível das comunidades.

De um modo geral, a schistosomose predomina em áreas onde as estruturas sanitárias e recursos de saúde humanos e materiais são mais limitados, o que condiciona a realização de métodos de diagnóstico como a PCR em estudos no terreno. Na perspetiva de colmatar esta limitação, alguns métodos baseados na PCR encontram-se em fase de validação, como a técnica de *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), que é uma técnica de PCR baseada na tecnologia isotérmica de amplificação de ácidos nucleicos e sem recurso a equipamentos mais sofisticados como termocicladores, e os resultados visualizados de imediato, o que a torna passível de ser realizada em laboratórios com menos recursos (Notomi *et al.*, 2000).

Segundo Fernandez-Soto *et al.* (2014) e Lodh *et al.* (2014), a sensibilidade e especificidade da técnica de LAMP no diagnóstico de infeção simples e mista (*S. haematobium* e/ou *S. mansoni*) foram idênticas às da PCR, usada como referência. De acordo com os resultados de Gandasegui *et al.* (2018), no primeiro estudo realizado no Brasil aplicando a técnica de LAMP na deteção simultânea de *S. mansoni* em amostras humanas (fezes) e em moluscos hospedeiros intermediárias (*Biomphalaria straminea*), numa área de baixa transmissão, a sua sensibilidade foi bastante superior tanto na infeção humana, comparando com o método de Kato-Katz “gold standard”, como na deteção do parasita em moluscos, em comparação com a técnica de referência, a nested-PCR.

Além disso, mostrou ser mais económica e exequível em laboratório de campo, devido à simplicidade de execução, interpretação dos resultados e com menos custos. Por

outro lado, é cada vez mais consensual a integração destes métodos moleculares em estudos malacológicos, uma vez que possibilitam a deteção dos parasitas nos respetivos moluscos hospedeiros intermediários na fase pré-patente, tornando-os ferramentas promissoras na identificação de potenciais áreas de risco e na monitorização dos programas de controlo (Abbasi *et al.*, 2010; Hamburger *et al.*, 2013; Caldeira *et al.* 2017).

Um outro método em fase de avaliação no terreno visa a deteção de antigénio circulante catódico (*cathodic circulating antigen* - CCA) na urina, excretado pelos vermes adultos ativos de *Schistosoma* spp. Os resultados de estudos em curso indicam que o método apresenta sensibilidade e especificidade elevadas para qualquer dos agentes, embora mais pronunciada na infeção por *S. mansoni*. O facto de ser um teste rápido, em formato imunocromatográfico e ser aplicado na urina, mais fácil de obter dos participantes, e a sua relação custo-eficácia, poderá ser o método ideal para rápido mapeamento e avaliação do controlo terapêutico nas comunidades mais remotas (Danso-Appiah *et al.*, 2016).

Em relação à intensidade do parasitismo, avaliada pelos métodos parasitológicos e microscopia, os nossos resultados corroboram os de estudos anteriores (MINSA, 2005; Figueiredo, 2014); a maioria dos participantes (87%) apresentava uma carga parasitária moderada (<50 ovos/10 ml de urina) para *S. haematobium*, sendo a mediana de 21,7 ovos/10 ml. Contudo, o predomínio de infeção pesada ( $\geq 50$  ovos/10 ml) verificou-se nos adultos ( $\geq 40$  anos). Quanto à carga parasitária de *S. mansoni*, também predominou o grau moderado (<400 ovos/grama de fezes, mediana=120 opg) na maioria (84,4%) dos parasitados e nas crianças e jovens com idades compreendidas entre os 11 e 20 anos.

No que respeita à distribuição da schistosomose em relação ao género e à idade, apesar do maior número de participantes do género feminino (Tabela 11), a infeção pelas duas espécies foi predominante no género masculino, com diferenças significativas ( $\chi^2$ ,  $P=0,048$ ) no caso de *S. haematobium* (Figura 27), sobretudo nos mais jovens ( $\leq 10$  anos). É possível que esta diferença esteja relacionada com a idade e atividades (Tabela 11), atendendo a que a maioria da população examinada pertencia aos grupos etários mais jovens (<20 anos) e estudantes (62%), sendo o que mais contacto tinham com os cursos



de água doce em atividades recreativas.

Este padrão epidemiológico é característico na schistosomose nas áreas endêmicas (Zacharias *et al*, 2002; Palmeira *et al*, 2010; Tchuem Tchuente *et al*, 2013; Lodh *et al*, 2014). Geralmente a infecção é adquirida na infância sendo também este grupo populacional o que apresenta cargas parasitárias mais elevadas devido ao efeito cumulativo do parasitismo resultante da exposição frequente (Rey, 1987, Webster *et al*, 1997, Palmeira *et al*, 2010).

A intensidade da infecção é considerada um indicador da morbidade uma vez que existe uma correlação direta entre a carga parasitária e as manifestações clínicas da doença (Clements *et al*, 2008); na ausência de tratamento, a infecção tende a evoluir para a cronicidade, com os efeitos patológicos a nível do trato urinário e/ou intestinal, dependendo da espécie. Por estas razões, as crianças constituem o grupo-alvo dos programas de controlo da doença, incluindo recentemente o grupo pré-escolar (3-5 anos) (WHO, 2013a).

No entanto, outros grupos de risco abrangem adultos cujas atividades profissionais (agricultores, pescadores) ou domésticas obrigam a exposição frequente a coleções hídricas infetantes (Ibironke *et al*, 2011), o que poderá explicar a prevalência de cargas parasitárias pesadas por *S. haematobium* em indivíduos adultos agricultores, principalmente na Huíla.

Nos participantes das quatro províncias-alvo do estudo, constata-se que a infecção por *S. haematobium* continua a ser expressiva (Figura 34), com prevalências que variaram entre 72,5% e 100% o que traduz a magnitude da parasitose em todas as províncias. A taxa mais elevada registada na província do Bengo poderá ser devida, entre outras causas, às condições hidrográficas e ambientais favoráveis à disseminação dos moluscos hospedeiros intermediários. Com efeito, a província possui um número considerável de rios, canais de irrigação, lagoas e uma barragem o que propicia o contacto frequente da população com as águas, para as suas diversas atividades (WHO, 2002; MINSA, 2005), sendo o risco de infecção, segundo Sousa-Figueiredo *et al*, (2012), consideravelmente mais elevado na barragem (OR= 22,23) do que em rios (OR=4,72).

Ao contrário das diferenças inter-regionais e com significado estatístico ( $\chi^2$ ,  $P=0,015$ ) obtidas com os métodos diretos, estas não se verificaram com a inclusão da análise molecular, o que reforça a vantagem adicional desta técnica na obtenção de

indicadores mais precisos sobre a prevalência real da parasitose.

Constata-se, também, que a situação epidemiológica da schistosomose urogenital no país permanece idêntica ou até mais elevada do que há várias décadas, conforme os registos de vários estudos efetuados por diversos autores (Mesquita, 1952; Grácio, 1977a, b e c; Chipopa, 2000; Belo *et al.*, 2005; Dumba, 2006; Figueiredo, 2014), entre outros. Este facto será reflexo de situações complexas ocorridas no país e reforça a prioridade de investimento em programas de controlo adequados.

Quanto à endemicidade de *S. mansoni*, aparentemente continua a ter uma distribuição mais restrita às regiões do centro e norte do país (MINSA, 2005; Dumba, 2006), uma vez que não foram encontrados casos positivos na província do Bengo. É possível que os casos identificados em Luanda possam ser de indivíduos originários daquelas regiões, atendendo a que em estudos anteriores não foram detectados casos autóctones na província de Luanda.

Das três províncias em que se detetaram casos de parasitismo pelas duas espécies, Malange é a que apresenta as prevalências mais elevadas tanto para *S. haematobium* como para *S. mansoni* (Tabela 11), ao passo que nas duas restantes (Luanda e Huíla), as prevalências de *S. mansoni* foram consideravelmente inferiores às de *S. haematobium*.

De acordo com as observações dos clínicos do serviço de Urologia do Hospital Américo Boavida em Luanda (Figueiredo, 2014), os doentes com schistosomose urogenital oriundos de Malange apresentam, geralmente, lesões patológicas mais frequentes e de maior gravidade, incluindo carcinomas invasivos de pior prognóstico assim como uma resposta à terapêutica (PZQ) menos eficaz, sendo necessário, por vezes, efetuar até cinco ciclos de tratamento. Desconhecem-se as razões para estas diferenças mas uma das hipóteses poderá ser atribuída à infecção pelos dois agentes etiológicos, fator sugerido por Meurs *et al.*, (2012) perante observações similares no Senegal. Segundo Rollinson *et al.*, (1997) e Curtis *et al.*, (2000), as diferenças observadas a nível das manifestações clínicas em diversas regiões, poderá ser devida a “estirpes” de *S. haematobium* e de *S. mansoni* dotadas de maior capacidade infetante, imunogenicidade e patogenicidade.

Para além do parasitismo por schistosomas, verificámos também a coinfeção por

helminthas intestinais em diversos indivíduos (Figura 13), com destaque para os geohelminthas *Ascaris lumbricoides*, ancilostomídeos, *Trichuris trichiura* e *Strongyloides stercoralis*, o que está em concordância com alguns estudos realizados no país (Chipopa, 2000; MINSA, 2005; Figueiredo, 2008; Bocanegra *et al.*, 2015). A infecção concomitante de *Schistosoma* com geohelminthas (e outros parasitas) ocorre com frequência em áreas endêmicas, pelo que os programas de controlo para a schistosomose integram igualmente as geohelminthoses (WHO, 1998, Savioli *et al.*, 2004) uma vez que afetam os grupos populacionais com condições sociais e económicas mais precárias.

Relativamente à associação verificada entre *S. haematobium* e *S. mansoni* com ancilostomatídeos e *S. stercoralis* poderá ser explicada pelo facto de ocuparem os mesmos espaços no ambiente. Os ancilostomatídeos e *Strongyloides* têm preferência por locais de clima quente e húmido como as margens dos rios ou lagoas e provavelmente as crianças ter-se-ão infetado nestes locais, em virtude de andarem descalças nas horas do mergulho, favorecendo a penetração das larvas destes parasitas na pele.

É reconhecido o impacte significativo que estas helmintoses provocam não só na saúde e desenvolvimento psicomotor e cognitivo nas crianças, mas também nos adultos, afetando a produtividade e o rendimento, contribuindo para o ciclo de pobreza, especialmente na África Subsariana. Devido às características biológicas destes parasitas e, em particular, à absorção de micronutrientes e a hemotofagia dos vermes adultos de *Schistosoma* spp (fêmeas), ancilostomídeos e *T. trichiura*, são um dos fatores causais ou potenciais de anemia ferropénica, com repercussões no estado nutricional e imunológico, especialmente em crianças e mulheres grávidas ou em período de amamentação (Petney e Andrews, 1998; Faust e Craig, 2003; Bethony *et al.*, 2006; Adenowo *et al.* 2016).

À semelhança de observações anteriores no país (Figueiredo, 2008; Jeremias *et al.*, 2010, Sousa-Figueiredo *et al.*, 2012) e em outras áreas endêmicas (Friedman *et al.*, 2005; Ajanga *et al.*, 2006; Bates *et al.*, 2007), os resultados deste estudo também evidenciam uma associação entre o parasitismo por *Schistosoma* spp e a presença de anemia (Figura 36), como uma correlação negativa e significativa ( $r_0 = -0,258$ ;  $P = 0,025$ ) com a intensidade do parasitismo, sobretudo nos casos de infecção por *S. mansoni* (Figura 36).

Embora nesta investigação não se tenha observado uma correlação significativa entre os helmintas intestinais e o grau de anemia (Figura 37), verificou-se que os níveis da hemoglobina e do hematócrito eram mais baixos nos indivíduos infetados por estes parasitas. No entanto, existem fortes evidências que comprovam que as infeções causadas por helmintas podem contribuir para o aumento de síndromes inflamatórias, prejudicando a eritropoiese e interferindo na mobilização das reservas do ferro e retículo endotelial assim como a redução da sobrevivência de eritrócitos (Shaw e Friedman, 2011).

Estas síndromes são agravadas pela infeção simultânea por vários agentes parasitários, independentemente da carga parasitária, como demonstraram Ezeamama *et al*, (2005), em um estudo realizado nas Filipinas em crianças com poliparasitismo de baixa intensidade, a prevalência de anemia era cinco vezes superior em comparação com as não parasitadas.

Em consequência dos efeitos negativos diretos e sinérgicos das infeções por schistosomas e geohelmintas na etiologia da anemia ferropénica e o efeito positivo da administração simultânea de antihelmíntico e suplemento ferroso, tem sido recomendada a inclusão desta avaliação e aborgem terapêutica nos cuidados primários de saúde (Tohon *et al*. 2008; Ayoya *et al.*, 2012; Taylor-Robinson *et al*, 2015).

Quanto ao tratamento da schistosomose, o praziquantel (PZQ) é o fármaco de eleição devido à ação schistosomicida eficaz para todas as espécies de *Schistosoma* patogénicas para os humanos. Pelo facto de ser um fármaco de fácil administração (dose única oral) e praticamente sem efeitos secundários ou mínimos, tem sido amplamente utilizado nos programas de controlo da doença há cerca de 30 anos. No entanto, têm vindo a ser reportados casos de possível resistência/tolerância ao PZQ, quer em regiões com programas de controlo regulares, quer em áreas com pouca pressão terapêutica (Melman *et al*, 2009; Wang *et al*, 2012), não se excluindo a possibilidade de existirem populações parasitárias naturalmente tolerantes ou menos sensíveis ao fármaco e/ou à dosagem recomendada.

De acordo com Davies *et al*, (2001) e Doenhoff *et al*, (2009), a administração de PZQ em larga escala pode levar a novas e intensas pressões sobre o parasita, incluindo, a seleção de parasitas fármaco-resistentes, seleção esta que pode mudar rapidamente os fenótipos de infecciosidade e virulência do parasita bem como a estrutura genética

populacional dentro de poucas gerações.

Como foi referido anteriormente, a presença de estirpes de *S. haematobium* aparentemente tolerantes ao PZQ na população de Malange, levou-nos a investigar a eventual existência de diversidade genética intrapopulacional comparativamente aos parasitas isolados em Luanda. Os resultados da análise por RAPD-PCR sugerem diferenças genéticas entre as duas populações parasitárias, evidenciadas pelo número de bandas exclusivas presentes nos isolados de cada região e pelo coeficiente de similaridade (Tabela 18) assim como pela análise da distância genética (Figura 42).

Era expectável que os valores do coeficiente de similaridade estivessem próximos de 1, ausência de diversidade, mas curiosamente estes valores são extremamente baixos (0,55 e 0,35 para os primers A01 e A02, respetivamente), o que sugere variação genética inter-regional.

No entanto, a análise molecular dos microssatélites, para identificação mais precisa de eventuais mutações a nível do DNA, produziu resultados pouco consistentes. Dos sete pares de *primers* utilizados para cada amostra, 87 de *S. haematobium* (Tabela 3) e 40 de *S. mansoni* (Tabela 7), apenas dois pares de *primers* para cada espécie produziram amplificações consistentes, número insuficiente para uma análise robusta da caracterização alélica comparativa. A presença de inibidores nas amostras biológicas poderá ter tido influência nestas reações, uma vez que os 14 *loci* selecionados aplicados em estudos anteriores (Norton *et al.*, 2010; Gower *et al.*, 2013), permitiram identificar altos níveis de diversidade genética nas populações de *S. mansoni* e *S. haematobium* em seis países diferentes da África subsariana (Quênia, Tanzânia, Mali, Níger, Uganda e Camarões), tanto a nível regional como continental.

Investigações de diversos autores (Webster *et al.*, 2012; Gower *et al.*, 2011, 2013; Glen *et al.*, 2013) sobre a diversidade genética populacional de *Schistosoma* spp. de diferentes regiões, confirmaram a existência de um haplotipo de *S. haematobium*, sugerindo que na recente história evolutiva do parasita poderá ter havido uma seleção genética seguida de expansão da população.

A transmissão de *Schistosoma* spp. é complexa, resultante da inter-relação de múltiplos fatores quer de contexto social (económicos, culturais, demográficos,

comportamentais,) quer de contexto ecológico (ambientais, biológicos). Contudo, dos diversos fatores que intervêm na transmissão de *Schistosoma* spp, e de outras doenças tropicais negligenciadas (DTN), é reconhecido o peso preponderante dos determinantes sociais e económicos, com destaque para a ausência ou deficiência no abastecimento de água potável e de saneamento básico (UNICEF, 1998; Belo *et al.*, 2005; WHO, 2012; Grimes *et al*, 2014).

Estes fatores são responsáveis pela elevada exposição da população aos focos de infecção hídricos e ambientais, para a realização quotidiana das suas atividades profissionais, domésticas e de de higiene individual, assim como pela contaminação das coleções de água e do ambiente. Para além disso, o precário *status* socioeconómico é um fator limitante ao acesso a cuidados de saúde primários (Coutinho *et al*, 1992; King & Bertino, 2008; King, 2010).

As condições sociodemográficas da população analisada neste estudo (Tabela16) são demonstrativas da direta relação com a prevalência da schistosomose (e das helmintoses intestinais). Com efeito, a maioria dos participantes residia em áreas rurais e suburbanas com condições precárias a nível de água canalizada e saneamento básico nas habitações, principalmente na área rural. Precisamente nesta área foi onde se observou um maior número de casos positivos quer de *S. haematobium* (60,8%) em comparação com os residentes no meio suburbano (38,1%), quer de *S. mansoni* (72,9% vs 20,3%). Por sua vez, as precárias condições básicas (água e saneamento) mais comuns na área rural, foram os fatores mais expressivos da sua relação com o estado parasitológico, comparativamente aos que possuíam essas condições, o que explica a elevada prevalência da parasitose.

Está demonstrado que o investimento na melhoria destas condições sociais tem um efeito considerável na redução da schistosomose e de outras infeções parasitárias, sendo dos pilares mais eficazes nos programas de controlo integrado (King *et al*, 2006; WHO, 2009; Grimes *et al*, 2014).

## **6. Conclusões e Recomendações**

## **6. Conclusões e Recomendações**

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a amplitude e elevada prevalência da schistosomose nas comunidades mais desfavorecidas social e economicamente dos meios suburbanos e rurais do país. Atendendo à morbilidade causada pela infeção, é fundamental que os programas de controlo tenham sustentabilidade e sejam monitorizados regularmente nestas áreas. A obtenção de indicadores mais precisos sobre a situação epidemiológica e o impacto das medidas de controlo são necessários para implementação de abordagens mais seletivas e adaptadas a determinados contextos sociodemográficos.

Perante os nossos resultados e de outros estudos efetuados consideramos de maior importância o investimento a nível do diagnóstico, da prevenção e educação para a saúde, e do desenvolvimento social nas comunidades de maior risco.

Em relação ao diagnóstico, é reconhecida a limitação dos métodos parasitológicos aplicados em estudos epidemiológicos e, neste sentido, a inclusão dos métodos de biologia molecular como a PCR podem contribuir para fornecer estimativas mais precisas sobre a prevalência real da parasitose. Como verificámos neste estudo, a conjugação destes métodos foi significativa, particularmente nos casos de baixa intensidade de parasitismo não detetados nos exames por microscopia.

Nestas circunstâncias, será possível atuar de forma mais eficaz a nível do tratamento, com efeitos positivos tanto a nível individual (impedindo a progressão da doença) como a nível da transmissão (redução dos reservatórios dos parasitas).

Acresce que a aplicação de métodos moleculares irá permitir um melhor conhecimento sobre a estrutura genética das espécies de *S. haematobium* e de *S. mansoni* endémicas e a sua eventual diversidade, informações que poderão ser relevantes no contexto clínico, terapêutico e na farmacovigilância em programas de controlo.

Devido à distribuição geográfica de *S. mansoni*, poucos estudos têm sido realizados no país sobre a magnitude da morbilidade da schistosomose intestinal. No entanto, como constatamos, a prevalência desta espécie em certas províncias não é negligenciável e, no caso de Malange, situa-se praticamente ao mesmo nível de *S.*



*haematobium*. Neste sentido, consideramos relevante a sua investigação de modo a conhecer o seu impacto a nível clínico e epidemiológico. Com a movimentação constante da população e as alterações hidrológicas, com a construção de novas barragens, registada nestes últimos anos, é de admitir que tenha havido expansão da sua área de endemicidade tradicional e consequente aparecimento de novos focos noutras regiões vizinhas. A realização de estudos malacológicos, previamente à implementação e durante os programas de controlo, podem fornecer dados bastante úteis e ser uma mais valia na referenciação de potenciais áreas de risco.

A nível das medidas de prevenção, que incidem sobretudo nas crianças em idade escolar (5-14 anos), é fundamental a inclusão de outros grupos etários, nomeadamente jovens e adultos com atividades profissionais de maior exposição a *Schistosoma* spp. Como se constatou no presente estudo, o maior número de parasitados verificou-se em crianças e jovens e, de acordo com os clínicos no país (Figueiredo, 2014), é frequente a observação de lesões secundárias a nível do trajeto uretral com microgranulomas específicos da infeção por *S. haematobium* em adolescentes e jovens. Assim, justifica-se a integração deste grupo no tratamento preventivo, de forma a evitar a evolução para os estádios mais graves da doença.

Adicionalmente, a investigação e tratamento simultâneos de morbilidades associadas, nomeadamente as helmintoses intestinais e as resultantes direta ou indiretamente por estas parasitoses, como a anemia por deficiência de ferro, tem demonstrado ser uma abordagem com efeitos positivos mais rápidos a nível da saúde. Na avaliação hematológica e parasitológica efetuada neste estudo, verificamos não só uma elevada frequência de geohelmintoses associadas às infeções por *Schistosoma* spp., como também a sua ação nos quadros de anemia.

Em relação aos fatores sociais, é fundamental maior envolvimento e investimento das autoridades governamentais a nível provincial e central, a nível do abastecimento de água tratada e saneamento básico nas comunidades, bem como de infraestruturas sanitárias mais acessíveis às populações.

A principal estratégia de controlo da schistosomose tem sido a quimioterapia em massa com PZQ mas cedo se verificou que esta abordagem exclusiva era insuficiente para uma redução eficaz da parasitose, sendo fundamental a integração de várias medidas.

## **7. Referências bibliográficas**

## 7. Referências Bibliográficas

Abbasi, I., King, C. H., Muchiri, E. M., Hamburger, J., 2010. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: identification of infected snails from early prepatency. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene*; **83**:427±432.

Abdel-Haidi, A. M., & Talaat M., 2000. Histological assessment of tissue repair after treatment of human schistosomiasis. *Acta Tropica*, **77**(1): 91- 96.

Adenowo, A.F., Oyinloye B.E., Ogunyinka, B.I., Kappo, A.P., 2015. Impact of human schistosomiasis in sub-Saharan Africa. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **19**(2): 196-205.

Ajanga, A., Lwambo, N. J. S., Blair, L., Nyandindi, U., Fenwick, A., Brooker, S., 2006. “*Schistosoma mansoni* in pregnancy and associations with anaemia in northwest Tanzania.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **100**(1): 59 – 63.

Akinwale, O. P., Hockt, T., Chia-Kwung, F., Zheng, QI, Haimo, S., Charles, E., Gyang Pam, V., 2014. Differentiating *Schistosoma haematobium* from *Schistosoma magrebowiei* and other closely related schistosomes by polymerase chain reaction amplification of a species specific mitochondrial gene. *Tropical Parasitology*, **4**, 38-42.

Alberts B., 1997. Tecnologia do DNA recombinante. In: *Biologia Molecular da Célula*. 3ª Edição. Artes Médicas, Capítulo 7: 291-334.

Anchang-Kimbi, J. K., Elad, D. M., Sotoing, G. T., & Achidi, E. A., 2017. Coinfection with *Schistosoma haematobium* and *Plasmodium falciparum* and anaemia severity among pregnant women in Munyenge, mount Cameroon area: A cross-sectional study. *Journal Parasitology Research*, **2017**: 6173465.

Andrade, L. 2005. Proteínas quinase eucarióticas (ePKs) de *Schistosoma*: identificação, anotação funcional e seleção de potenciais alvos terapêuticos. Tese de doutoramento, Brasil 143 pp.

Angeli, V., Faveeuw C., Roye O., Fontaine J., Teissier E., Capron A., Wolowezuk I., Capron M., Trottein F., 2001. Role of the parasite derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. *Journal of Experimental Medicine*, **93**(10): 1135-1147.

Araujo, K. C. G. M., Rosa e Silva, C. M., Barbosa, C. S., Ferrari, T. C., 2006. Clinical epidemiological profiles of children with schistosomal myeloradiculopathy attend at Instituto Materno-Infantil de Pernambuco (IMIP). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**:149-156.

Ayoya, M.A, Spiekermann-Brouwer, G.M., Traoré, A.K., Garza, C., 2012. Effect on school attendance and performance of iron and multiple micronutrients as adjunct to drug treatment of *Schistosoma*-infected anemic schoolchildren. *Food Nutritional Bulletin*, **33**(4):235-41.

Barakat, R. M. R., 2013. Epidemiology of schistosomiasis in Egypt. Travel throught time: review. *Journal of Advanced Research*, **4**:425-432.

Barbosa, C. S., 1995. Determination and control of schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **90**:155 - 159.

Barbosa, C. S., Araújo, K. C., Sevilha, M. A. A., Melo, Gomes, E. C. S., Souza-Santos, R., 2010. Situação epidemiológica atual da esquistossomose no estado de Pernambuco Brasil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **105** (4): 549 – 554.

Barral, V., This P., Imbert-Establet D., Combes C., Delseny M., 1993. Genetic variability and evolution of *Schistosoma mansoni* genome analysed using Randon Amplified Polymorphic DNA markers. *Molecular Biochemical Parasitology* **57**: 211 - 222.

Barreto, M. L., Smith D. H. & Sleight A. C., 1990: Implications of faecal egg count variation when using the Kato-Katz method to assess *Schistosoma mansoni* Infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **84**: 554 - 555

Bates, I., McKew, S., Sarkinfada, F., 2007. Anaemia: a useful indicator of neglected disease burden and control. *PLoS Medecine*, **4**(8):e231.

Belo, S., Rompão, L., Gonçalves, L., Grácio, M. A. A., 2005. Prevalence, behavioural and social factors associated with *Schistosoma intercalatum* and geohelminth infections in São Tomé and Príncipe. *Parassitologia*, **47**:227-231.

Belo, S., 2010. Diagnóstico de helmintoses: Execução do Método de Telemann- Lima. XI Curso de Mestrado em Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa- IHMT.

Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ., 2006. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*; **367**(9521):1521-32.

Betson M, Sousa-Figueiredo JC, Kabatereine NB, Stothard JR., 2013. New Insights into the Molecular Epidemiology and Population Genetics of *Schistosoma mansoni* in Ugandan Pre-school Children and Mothers. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; **7**. e2561

Bin-Dajem S. M., Ibrahim E. H., Al-Quraishy S. A., Mostafa O. M., 2011. Fingerprint of *Biomphalaria Arabica*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni* in Saudi Arabia, using RAPD-PCR. *Gene*. **485**(2): 69 – 72.

Blair, D., van Herwerden, L., Hirai, H., Taguchi, T., Habe, S., Hirata, M., Lai, K., Upatham, S., Agatsuma, T., 1997. Relationships between *Schistosoma malayensis* and other Asian schistosomes deduced from DNA sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* **85**:259 -263

Blair, L., Webster, J. P., Barker, G. C., 2001. Isolation and characterization of

polymorphic microsatellite markers in *Schistosoma mansoni* from Africa. *Molecular Ecology. Notes* **1**: 93–95.

Bocanegra, C., Gallego, S., Mendioroz, J., Moreno, M., Sulleiro, E., Salvador, S., Sikaleta, N., Nindia, A., Tchipita, D., Joromba, M., Kavaya, S., Montalvá, A. S., López, T., Molina, I., 2015. Epidemiology of Schistosomiasis and Usefulness of Indirect Diagnostic Tests in School-Age Children in Cubal, Central Angola. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **9**(10):e0004055.

Booth, M., Vennervald, B. J., Kenty, L., Butterworth, A. E., Kariuki, H. C., Kadzo, H., Ileri, E., Amaganga, C., Kimani, G., Mwatha, J. K., Otedo, A., Ouma, J. H., Muchiri, E., Dunne, D. W., 2004. Micro-geographical variation in exposure to *Schistosoma mansoni* and malaria, and exacerbation of splenomegaly in Kenyan school-aged children. *BMC Infectious Diseases*, **4**: 13.

Brouwer, K. C., Ndhlovu, P. D., Wagatsuma, Y., Munatsi, A., Shiff, C. J., 2003. Epidemiological assessment of *Schistosoma haematobium* – induced kidney and bladder pathology in rural Zimbabwe. *Acta Tropica*, **85**(3): 339-347.

Bruscky, I. S., de Melo, F. L., de Medeiros, Z. M., Albuquerque, F. F., Wanderley L. B., da Cunha-Correia C., 2016. Nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid for diagnosing spinal cord schistosomiasis: A promising method. *Journal of the Neurological Sciences*, **366**: 87-90.

Caldeira, R. L., Teodoro, T. M., Jannotti-Passos, L. K., Lira-Moreira, P. M., Goveia, C. O., Carvalho O. D., 2016. Characterization of South American Snails of the Genus *Biomphalaria* (Basommatophora: Planorbidae) and *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Trematoda) in Molluscs by PCR-RFLP. *BioMed Research International*. Article ID 1045391, 5 pages.

Caldeira, R. L., Jannotti-Passos, L. K., Dos Santos Carvalho, O., 2017. Use of molecular methods for the rapid mass detection of *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes:

Trematoda) in *Biomphalaria* spp. (Gastropoda:Planorbidae). *Journal of Tropical Medicine*; **8628971**, 6 pp.

Cardoso, S. M. P. P., 2010. Schistosomose urinaria e helmintoses intestinais: Contribuição para o estudo clinico-epidemiológico e da resposta imune humoral na comunidade angolana, Provincia do Bengo (Ibéndua, Sungue e Úlua). Tese de Mestrado, IHMT/UNL, 171 pp.

Carvalho, A. C. M., Janz, G. J. & Mexia, T. J., 1966. Hospedeiros intermediários de esquistossomas humanos em Angola. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, **33** (1-2): 59-98.

Chalersworth, B., Sniegowski, P., Stephan, W., 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, **371**:215-220.

Cheever, A. W., Powers, K. G., 1968. Counting of *Schistosoma mansoni* eggs in faeces. Comparison of a filtration technique and a dilution technique. *Journal Parasitology* **54** (3): 632-633.

Chen, L., Rao, K. V., He, Y. X., and Ramaswamy K., 2002. “Skin-stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* produce an apoptosis – inducing factor that can cause apoptosis of T cells”. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(37): 34329 – 34335.

Chieffi, P. P., Kanamura, H., 1978. Diagnóstico laboratorial da schistosomose mansônica. *Revista Brasileira Malarial Doenças Tropicais*, **30**: 77-97.

Chipopa, A. C. B., 2000. Contribuição para o conhecimento das shistosomose humana e de helmintas intestinais na Província de Luanda, Angola. Tese de Mestrado, IHMT/UNL: 82 págs.

Chitsulo, L., D., Engels, A. Montresor, Savioli, L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, **77**: 41-51.



Chitsulo, L., Loverde, P., & Engels, D., 2004. Focus: Schistosomiasis. *Nature Reviews Microbiology*, **2**: 12-13.

CISA, 2011. Inquérito epidemiológico de malária, schistosomose e geohelmintíase às populações do Dande (Bengo/Angola). Centro de Investigação em Saude de Angola. *Cadernos do CISA* Nº2: 20 pags.

Clements, A. C. A., Barnett, A. G., Nyandindi, U., Lwambo, N. J. S., Kihamia, C. M., & Blair, L., 2008. Age and gender in self-reported urinary schistosomiasis in Tanzania. *Tropical Medicine and International Health*, **13** (5): 713-721.

Cobbold, T. S., 1864. Remarks on Dr Harley's papaer "Haematuria of the Cape of Good Hope". *Lancet*, i:156-157.

Colley, G. D., 1996. Anciet Egypt and today: enough scourges to go around (Letter). *Emerging Infectious Diseases*, **2**(4): 362-363.

Cook, G. C. & Zumla, A., 2009. Manson`s Tropical Diseases. (22<sup>a</sup> Edition), *Saunders Elsevier*, London, 1847 pp.

Coutinho, A., Silva, M., Gonçalves, J., 1992. Estudo epidemiológico de Esquistossomose Mansônica em áreas de irrigação do Nordeste Brasileiro. *Caderno de Saúde Pública*, **8**: 302-310.

Curtis, J., Sorensen, R. E., Page, L. K., Minchella, D. J., 2001. Microsatellite loci in the human blood fluke *Schistosoma mansoni* and their utility for other schistosome species. *Molecular Ecology Notes*, **1**:143–145.

Dabo, A., Durand, P., Morand, S., Diakite, M., Langand, J., Imbert-Establet, D., Doumbo, O., Jourdane, J., 1997. Distribution and genetic diversity of *Schistosoma haematobium* within its bulinid intermediate hosts in Mali. *Acta Tropica*, **66**(1): 15 – 26.

Danso-Appiah, A., Minton, J., Boamah, D., Otchere, J., Asmah, R. H., Rodgers, M., Bosompem, K. M., Eusebi, P., De Vlas, S. J., 2016. Accuracy of point-of-care testing for circulatory cathodic antigen in the detection of schistosome infection: systematic review and meta-analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, **94** (7): 522-533A.

Davies, C. M., Woolhouse, M. E. J., Webster, J. P., 2001. Tradeoffs in the evolution of virulence schistomes: macroparasites with an indirect lifecycle. *Proceedings of the Royal Society of London: Series B* 268: 251- 257.

De Jonge, N., 1991. Levels of Schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**(6): 756 -759.

De Jonge, N., Rabello, A. L., Krijger, F. W., Kremsner, P. G., Rocha, R. S., Katz, N., Deelder, A. M., 1991. Levels of the schistosome circulating anodic and cathodic antigens in serum of schistosomiasis patients from Brazil. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**: 756- 759.

De Vlas, S. J., & Gryseels, B., 1996. Worm Burdens in schistosome infections. *Parasitology Today*, **12**(3): 115-119.

De Vlas, S. J. & Gryseels, B., 1992. Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalence. *Parasitology Today*, **8**: 274-277.

Deelder, A. M., & Kornelis, D., 1980. A comparison of the IFA and the ELISA for the demonstration of antibodies against schistosome gut associated polysaccharide antigens in schistosomiasis. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, 64: 65-75.

Dias, L. C. S., Jesus, P. R., Deberaldini, E. R., 1982. Use of praziquantel in patient with *Schistosoma mansoni* previously treated with oxaminiquene and or hycanthone: resistance of *Schistosoma mansoni* to schistosomicidal agents. *Transactions Reviews*

Dias, L. C. S., Marçal-Júnior, O., Glasser, C. M., 1995. Control of schistosomiasis transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **90**: 285 – 288.

Dias Neto, E., Souza CP., Rollinson, D., Katz N., Pena SDJ, Simpson AJG 1993. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Molecular Biochemical Parasitology*, **57**: 83-88.

Dietrich, W. F., Miller, J., Steen, R., Merchant, M. A., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, M. J., Ingalls, K. A., O'Connor, T. J., 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*, **380**: 149 -152.

Doenhoff, M. J., Kusel, J. R., Coles, G. C., and Cioli, D., 2002. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*: **96**: 465-469.

Doenhoff, M. J., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: mecanismos de acção, resistência e novos derivados para schistosomose. *Current Opinion Infectious Diseases*, **21**: 659-667.

Doenhoff, M. J., Hagan P., Cioli D., 2009. Praziquantel: its use in control of schistosomose in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* **136**: 1825-1835.

Dumba, B., 2006. Contribuição para o estudo epidemiológico das schistosomose e helmintoses e helmintas intestinais, no Planalto Central de Angola – Provincias do Huambo e do Bié: Tese de Mestrado, IHMT/UNL.115 Pgs.

Dunne, D.W., & Pearce E. J., 1999. Immunology of hepatosplenic *schistosomiasis mansoni*: a human perspective. *Microbes infectious*, **1**(7): 553 – 560.

Dupin, N., Buffet, M., Marcelin, A., G., Lamotte, C., Gorin, I., Ait-Arkoub, Z., Treluyer, J. M., Bui P., Calvez, V., Peytavin, G., 2002. HIV and antiretroviral drug distribution in

plasma and fat tissue of HIV- Infected patients with lipodystrophy. *AIDS*, **16**(18): 2419-2424.

Durand, P., Sire, C., Therón, A., 2000. Isolation of microsatellite markers in the digenetic trematode *Schistosoma mansoni* from Guadeloupe Island. *Molecular Ecology* **9**: 997–998.

Ebrahim, A., El-Morshedy, H., Omer, E., El-Daly, S., Barakat, R., 1997. Evaluation of the Kato-Katz thick smear and formol ether sedimentation techniques for quantitative diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, **57**: 706-708.

Elbaz, T., & Esmat, G., 2013. Hepatic and intestinal schistosomiasis: review. *Journal of Advanced Research* **4**(5): 445-452.

Engels, D., Sinzinkayo, E., de Vlas, S. J., Gryseels, B., 1997. Intraspecimen fecal eggs count variation in *Schistosoma mansoni* infection. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* **57**: 571-577.

Engels, D., Chitsulo, L., Montresor, A., & Savioli, L., 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica*, **82**: 139-146.

Enk, M. J., Lustosa Lima, A. C., Drummond, S. C., Schall, V. T., Coelho, P. M. Z., 2008. The impact of the number of stool samples on the prevalence, the infection intensity and the distribution of the infection with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. *Acta Tropica*: **108**: 222–228.

Enk, M. J., Oliveira, E., Silva, G., Rodrigues, N. B., 2010. A salting out and resin procedure for extracting *Schistosoma mansoni* DNA from human urine samples. *BMC Research Notes* **3**: 115.

Enk, M. J., Oliveira, E., Silva, G., Rodrigues N. B., 2012. Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. *PloS One* **7**: e38947.

Esrey SA, Potash JB, Roberts L, Shiff C. 1991. Effects of improved water supply and sanitation on ascariasis, diarrhoea, dracunculiasis, hookworm infection, schistosomiasis, and trachoma. *Bulletin of the World Health Organization*. **69**:609–

Ezeamama, A. E., Friendman, J. F., Olveda, R. M., Acosta, L. P., Kurtis, J. D., 2005. Functional significance of low-intensity polyparasite helminth infections in anaemia. *The Journal of Infectious Diseases*, **192**: 2160 – 2170.

Faust, C., Beaver, C. P., Jung, R. C., Cupp, E. W., 2003. *Parasitologia Clinica*, 3ª edição MDM México, 783 pags.

Fernández-Soto, P., Gandasegui Arahuetes, J., Sánchez Hernández, A., López Abán, J., Vicente Santiago, B., Muro, A., 2014. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for early detection of *Schistosoma mansoni* in stool samples: a diagnostic approach in a murine model. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**(9):e3126.

Ferrari, T. C., Moreira, P. R., Cunha, A. S., 2004. Spinal cord schistosomiasis: a prospective study of 63 cases emphasizing clinical and therapeutic aspects. *Journal of Clinical Neuroscience*, **11**: 246-253.

Ferrer, E., Pérez, F., Bello, I., Bolívar, A., Lares, M., Osorio, A., León L., Amarista, M., Incani R. N., 2015. Polymerase chain reaction for the amplification of the 121-bp repetitive sequence of *Schistosoma mansoni*: a highly sensitive potential diagnostic tool for areas of low endemicity. *Journal Helminthology*, **89**(6): 769-73.

Figueiredo, J. T. G. C. de M., 2008. Contribuição para o estudo da epidemiologia e morbidade da schistosomose vesical na população adulta de Angola. Províncias de Luanda, Bengo e Kwanza- sul. Tese de mestrado. IHMT/UNL. 92 pp.

- Figueiredo, J. T. G. C. de M., 2014. Lesões causadas pelos ovos de *Schistosoma haematobium* como fator de risco em doenças crônicas urinárias das zonas endêmicas de Angola. Tese de Doutorado. IHMT/UNL. 140 pp.
- Figueiredo, J., Santos, A., Clemente, H., Lourenço, A., Costa, S., Grácio, M A. A., Belo, S., 2014. Schistosomose e apendicite aguda. *Acta Médica Portuguesa*; **27**(3): 396-399.
- Fisher, A. C., 1934. A study of the schistosomiasis of the Stanley Ville District of the Belgian Congo. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **28**: 277-306
- FNUAP, 2017. Acedendo ao Estado da População Mundial – 2017. *Relatório do Fundo das Nações Unidas para a População*.
- Friendman, J. F., Kanzaria, H. K., McGarvey, S. T., 2005. Human schistosomiasis and anaemia: the relationship and potential mechanisms. *Trends in Parasitology*, **28**(8): 386 – 392.
- Fritsch, P. & Rieserberg, L.H., 1996. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: Smith, T. B. & Wayne, R. K. (Edition). *Molecular genetic approaches in conservation*, New York: *Oxford University Press*, pp. 54-73.
- Gandasegui, J., Fernández-Soto, P., Muro, A., Simões Barbosa, C., Lopes de Melo, F., Loyo, R., de Souza Gomes, E. C., 2018. A field survey using LAMP assay for detection of *Schistosoma mansoni* in a low-transmission area of schistosomiasis in Umbuzeiro, Brazil: Assessment in human and snail samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **12**(3):e0006314.
- Gasmelseed, N., Nhasha, E., Karamiro, M. O., Abdelwahed, A. O., Hamdoun, A. E. E., 2014. Genetic diversity of *Schistosoma haematobium* parasite is not associated with severity of disease in an endemic area in Sudan. *Biological Molecular Chemical Infectious Diseases* **14**: 469.

Gentile, R. & Oliveira, G., 2008. Brazilian studies on the genetics of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*. **108** (2-3): 175-178.

Glenn, T. C., Lance, S. L., Mckee, A. M., Webster, B. L., Emery, A. M., Zerlotini, A., Oliveira, G., Rollinson, D., Faircloth, B. C., 2013. Significant variance in genetic diversity among populations of *Schistosoma haematobium* detected using microsatellite DNA loci from a genome-Wide database. *Parasite & Vectors*, **6**(1): 300.

Gomes, A. L., Melo, F. L., Werkhauser, R. P., Abath, F. G., 2006. Desenvolvimento de uma reação em cadeia da polimerase em tempo real para quantificação do DNA de *Schistosoma mansoni* . *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**: 133–136.

Gomes, L. I., Marques, L. H. S., Enk, M. J., Oliveira M. C., Coelho P. M. Z., Rabello A., 2010. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Shistosoma* infection in feces. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **4** (4): e664.

Gordon, C. A., Acosta, L. P., Gobert, G. N., Olveda, R. M., Ross, A. G., Williams, G. M., Gray, D. J., Harn, D., Li, Y., McManus, D. P., 2015. Real-time PCR demonstrates high prevalence of *Schistosoma japonicum* in the Philippines: implications for surveillance and control. *PLoS Neglected Tropical Disease* **9**(1): e0003483.

Gornnert R. M., & Vogel, H., 1955. Dependence on host and parasite strain of the successful therapy of experimental schistosomiasis. *Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie*, **6**(2): 193 – 198.

Gower, C. M., Shrivastava, J., Lamberton, P. H., Rollinson, D., Webster, B. L., Emery, A., Kabatereine, N. B., Webster, J. P., 2007. Development and application of an ethically and epidemiologically advantageous assay for the multilocus microsatellite analysis of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **134**(4): 523–536.

Gower, C. M., Gabrielli, A. F., Sacko, M., Dembelé, R., Golan, R., Emery, A. M., Rollinson, D. Webster, J. P., 2011. Population genetics of *Schistosoma haematobium*:

development of novel microsatellite markers and their application to schistosomiasis control in Mali. *Parasitology*, **138**: 978–994.

Gower, C. M., Gouvras, A. N., Lamberton, P. H., Deol, A., Shrivastava, J., Mutombo, P. N., Mbuh, P. N., Norton, A. J., Webster, B. L., Stothard, J. R., Garba, A., Lamine, M. S., Kariuki, C., Lange, C. N., Mkoji, G. M., Kabatereine, N. B., Gabrielli, A. F., Rudge, J. W., Fenwick, A., Sacko, M., Dembelé, R., Lwambo, N. J. S., Tchuem Tchuenté, Rollinson, D., Webster, J. P., 2013. Population genetic structure of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* from across six sub-Saharan African countries: Implications for epidemiology, evolution and control. *Acta Tropica*, **128**: 261– 274.

Grácio, M. A. A., 1977/78a. Incidência da bilharziose vesical em escolares do distrito de Luanda. I – Área do Bom Jesus. *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, **5**(1-4): 171-175.

Grácio, M. A. A. 1977/78b. Contribuição para o conhecimento da incidência de bilharziose vesical no distrito de Benguela Concelho de Vila Mariano Machado (Ganda). *Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, **5** (1/4): 285-288.

Grácio, M. A. A., 1980. Incidência da bilharziose vesical em escolares do distrito de Luanda. II - Áreas de Quifangondo, Funda, Viana, Lagoa Quilunda e Lagoa Panquila. *Jornal da Sociedade de Ciências Médicas Lisboa*, **144** (1): 71-79.

Grácio, M. A., Rollinson, D., Costa, C. & Nhaque, A. T., 1992. Intestinal Schistosomiasis report of the first cases in Guinea Bissau. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*: **96**-183.

Greenberg, R. M., 2013. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. *Parasitology*. **140**(12): 1534-1546.

Grevelding, C. G. Sommer G., Kunz W., 1997. Pairing regulates female specific gene expression in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **115** (Pt6): 635-640. Grimes, J. E.T.,



- Croll, D., Harrison, W. E., Utzinger, J., Freeman, M. C., Templeton, M. R., 2014. The relationship between water, sanitation and schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; **8**:e3296.
- Gryschek, R. C. B. & Chieffi, P. P., 2008. Esquistossomose. In Amato – Neto, V. Parasitologia: uma abordagem clínica. Rio de Janeiro: Elsevier, 175 – 184.
- Gryseels, B., Stelma, F. F., Talla I., van Dam, G. J., Polman, K., Sow, S., Diaw, M., Sturrock, R. F., Doehring, S. E., Kardorff, R., Decam, C., Niang, M., Deelder, A. M., 1994. Epidemiology, immunology and chemotherapy of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in Senegal. *Tropical Geography Medicine*, **46**: 209-219
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., & Kesters, L., 2006. Human schistosomiasis. *Lancet*, **368**: 1106-1118.
- Gryseels, B., 2012. Schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, **26**: 383 – 97.
- Gryseels, B., Strickland, G. M., 2013. Esquistossomose. *Medicina Tropical de Hunter e Doenças Infecciosas Emergentes*. 9ª edição Elsevier; Filadélfia, PA, EUA.
- Hamburger, J., He, N., Abbasi I., Ramzy, R. M., Jourdan J. Ruppel, A., 2001. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome infested water. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* **65**: 907 – 911.
- Hamburger, J., Abbasi, I., Kariuki, C., Wanjala, A., Mzungu, E., Mungai, P. *et al.*, 2013. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification suitable for molecular monitoring of schistosome-infected snails in field laboratories. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene*, **88**:344-351.

Hanelt, B., Adema C. M., Mansour M.H., Loker E. S., 1997. Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* using nested PCR. *Journal Parasitology*, **83**(3): 387-394.

Harley, J., 1864. On the endemic haematuria of the Cape of Good Hope. *Medical and Chirurgical Transactions*, **47**:55-72.

HDR Report, 2013. Human Development Index, values and rank changes in the 2013 HDR, Angola.

Hessler, M. J., Cyrs, A., Krenzke, S. C., Mahmoud, E. S., Sikasunge, C., Mwansa, J., Lodh, N., 2017. Detection of duo-schistosome infection from filtered urine samples from schoolchildren in Zambia after MDA. *PLoS One*, **12**(12):e0189400.

Hotez, P.J., Molyneux, D.H., 2008. Tropical anemia: one of Africa's great killers and a rationale for linking malaria and neglected tropical disease control to achieve a common goal. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2: e270.

Hotez, P. J. & Fenwick, A., 2009. Schistosomiasis in África: An Emerging Tragedy in Our New Global Health Decade. *PLoS Neglected Tropical Disease* **3**(9): e485.

Huyse, T., Maes, G.E., Geldof, S., Vereecken, K., Djibril, D., Rollinson, D., Webster, B.L., Polman, K., 2008. High genetic diversity in *Schistosoma mansoni* in the Senegal River Basin, a population genetic analysis 20 years after the epidemic outbreak. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, **79**: 296.

Huyse, T., Webster, B. L., Geldof, S. J., Stothard, R., Diaw, O. T., Polman, K., David Rollinson, D., 2009. Bidirectional Introgressive Hybridization Between a Cattle and Human *Schistosome* Species. *PLoS Pathogens* **5**(9): e1000571.

Ibironke, A. O., Phillips A. E., Garba, A., Lamine, S. M., Shiff, C., 2011. Diagnosis of *Schistosoma haematobium* by Detection of Specific DNA Fragments from Filtered Urine Samples. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* **84**(6): 998-1001.

Ibironke, O., Koukounari, A., Asaolu, S., Moustaki, I., Shiff, C., 2012. Validation of a new test for *Schistosoma haematobium* based on detection of Dra1 Fragments in urine: Evaluation through latent class analysis. *PLoS Neglected Tropical Disease*, **10**:1371.

Jannotti-Passos L. K., Vidigal, T.H., Dias-Neto E., Pena S. D., Simpson A. J., Dutra W. O., Souza C. P., Carvalho-Parra J. F., 1997. PCR amplification of the mitochondrial DNA minisatellite region to detect *Schistosoma mansoni* infection in *Biomphalaria glabrata* snails. *Journal Parasitology* **83**(3): 395-399.

Jeremias, R. I., 2007. Avaliação do impacte das helmintoses na etiologia da anemia por deficiência de Ferro. Estudo parasitológico e hematológico. *Tese de Mestrado IHMT/UNL* 91 pp.

Jeremias, I., Belo, S., Ferraz, F., Quivinja, J., Gonçalves, L. and Grácio, M. A. A., 2010. Pattern and impact of helminth infections in pregnancy: prospects for improvement maternal health in Angola. *International Symposium on Schistosomiasis*, Brazil.

Jeremias, I. Afonso A., Grácio M. A. A., Belo S., 2013. Genetic variability among *S. haematobium* and *S. mansoni* isolates from patients in Angola. *18º Congresso da Sociedade Espanhola de Parasitologia*. Las Palmas, Canárias.

Jeremias, I., Belo, S., Afonso, A., Grácio, M. A., 2015. Vantagem da PCR no estudo epidemiológico de *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mansoni* em Angola. *6ªs Jornadas Científicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical*.

Kassim, O. O., Cheever, A. W., Richards, C. S., 1979. *Schistosoma mansoni*: mice infected with different worm strains. *Parasitology* **48**: 220 - 224.

Katz, N. A., Chaves, A., Pellegrino J., 1972. A simple device for quantitative stool thick smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*. **14**:397- 400.

Kennedy, G., Nantel, G., Brouwer, I. D., Kok, F. J., 2006. Does living in an urban environment confer advantages for childhood nutritional status? Analysis of disparities in nutritional status by wealth and residence in Angola, Central African Republic and Senegal. *Public Health Nutrition* **9**: 187–193.

King, C. H., Malhotra, I., Mugai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Muchiri, E., Ouma, J. H., 2001. *Schistosoma haematobium* induced urinary tract morbidity correlates with increased Tumor Necrosis Factor and diminished Interleukin 10 production. *The Journal of Infectious Diseases*, **184**: 1176 – 1182

King, C. H., Sturrock, R. F., Kariuki, H. C., Hamburger, J., 2006. Transmission control for schistosomiasis – why it matters now. *Trends in Parasitology*, **22(12)**: 575 582.

King, C. H., 2007. Lifting the burden of schistosomiasis-defining elements of infection-associated disease and the benefits of antiparasite treatment. *The Journal of Infections Diseases*, **196**: 653 – 655.

King, C. H., Dangerfield-Cha, M., 2008. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis, *Chronic Illness*, **4(1)**: 65-79.

King C. H. & Bertino A. M., 2008. Asymmetries of poverty: why global burden of disease valuations underestimate the burden of neglected tropical diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **2**: e209.

King, C. H., 2010. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. *Acta Tropica* **113**: 95 – 104.

Kloetzel, K., 1992. Some personal views on the control of *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **90** (Supplement IV): 221 – 226.

Knight, W. B., Hiatt, R. A., Cline, B. L. Ritchie, L. S., 1976. A modification of the formol-ether concentration technique for increased sensitivity in detecting *Schistosoma*

mansoni eggs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **25**(6): 818 – 823.

Kongs, A., Marks, G., Verlé, P., Van der Stuyft, P., 2001. Limitations of Kato-Katz technique for evaluating *S. mansoni* infections. *Tropical Medicine and Health*, **6** (3): 163-169.

Koukounari, A., Webster, J. P., Donnelly, C. A., Bray, B. C., Naples, J., 2009. Sensitivities and Specificities of Diagnostic Tests and Infection Prevalence of *Schistosoma haematobium* Estimated from Data on Adults in Villages Northwest of Accra, Ghana. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* **80**: 435–441.

Krauth, S. J., Greter, H., Stete, K., Coulibaly, J., Traoré, S. I., Ngandolo, B. N. R., Achi, L. Y., Zinsstag, J., N’Goran, E. K., Utzinger, J., 2015. All that is blood is not schistosomiasis: experiences with reagent strip testing for urogenital schistosomiasis with special consideration to very-low prevalence settings. *Parasites & Vectors* **8**: 584

Kunz, W., 2001. Schistosome male-female interaction: induction of germ-cell differentiation. *Trends in Parasitology* **17**: 227 – 231.

Larotski, L. S. & Davis, A., 1981. The schistosomiasis problem in the world: results of a WHO questionnaire surveys. *Bulletin of the World Health Organization*.

Lawn SD, Lucas SB, Chiodini PL., 2003. Case report: *Schistosoma mansoni* infection: failure of standard treatment with praziquantel in a returned traveller. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*; **97**(1):100-1.

Le, T. H., 2000. Mitochondrial genomes of human helminthes and their use as markers in population genetics and phylogeny. *Acta Tropica*, **77**(3): 243 – 256.

Leal Neto O. B., Albuquerque, J., Gomes, E. C. S., Barbosa, C. S., 2011. Estratégias do futuro para enfrentar problemas do passado. *Scient American Brasil*. 106: 48- 51.

- Lei, J. C., Liu, Z. X. & Huang, Y. X., 2007. An imported case of *Schistosoma haematobium* infection from Angola. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, **25**: I.
- Leitão, J. 1989. Contribuição para o estudo da schistosomíase a *Schistosoma haematobium* em Angola. Tese. Direcção Nacional de Controlo de Endemias, 47 pp.
- Lenzi, H. L., Juberg A. D., Coelho, P. M. Z., Lenzi J. A., 2008. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: Carvalho O. S., Coelho, P. M. Z., Lenzi, H. L. Organizadores. *Schistosoma mansoni e Schistosomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Fiocruz **87**: 146.
- Leutscher PD, Ramarokoto CE, Hoffmann S, Jensen JS, Ramaniraka V, Randrianasolo B, Raharisolo C, Migliani R, Christensen N., 2008. Coexistence of urogenital schistosomiasis and sexually transmitted infection in women and men living in an area where *Schistosoma haematobium* is endemic. *Clinical Infectious Diseases*; **47**(6):775-82.
- Leutscher, P. D., Høst, E., Reimert, C. M., 2009. Semen quality in *Schistosoma haematobium* infected men in Madagascar. *Acta Tropica*; **109**(1):41-4.
- Liang, S., Yang, C., Zhong, B., Qiu, D., 2006. Re-emerging schistosomiasis in hilly and mountainous areas of Sichuan, China. *Bulletin World Health Org.* 84:139–144.
- Liang, L., Gong, Q., Zhang, H., Tao, W., Zhao, P., Chen, P. L., 2007. Effect evaluation of comprehensive control of schistosomiasis in Pujiang County 2001- 2005. *Parasitoses Infectious Disease* **1**: 26 – 27.
- Litt, M., & Luty J. A., 1989. A hyper variable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Genetics* **44**: 397- 401.

- Lodh, N., Jean, Naples, J. M., Kwabena, M., Bosompem, J., Quartey, J., Shiff, C. J., 2014. Detection of parasite specific DNA in urine sediment obtained by Filtration Differentiates between Single and Mixed Infections of *S. mansoni* and *S. haematobium* from Endemic Areas in Ghana. *PLOS ONE*, **9**(3): e91144.
- Maghema, T. N., 2005. Signs, meanings and actions associated to *haematobium Schistosomiasis* is Sasacaria, Bengo - Angola (Dissertação de Mestrado). *Centro de Pesquisas René Racheau, Fundação Oswaldo Cruz*. CDD, 22ª edição 616-963.
- Manneck, T., Haggmuller, Y., Keiser, J., 2010. Morphological effects and tegumental alteration induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *S. mansoni*. *Parasitology*, **137**: 85 – 98.
- Mao, S. P., & Shao, R. R., 1982. Schistosomiasis control in people's Republic of China. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **31**(1): 92-99.
- Marques, D. P., Rosa, F. M., Maciel, E., Negrão-Corrêa, D., Teles, H. M., Caldeira, R. L., Jannotti-Passos, L. K., Coelho, P. M., 2014. Reduced susceptibility of a *Biomphalaria tenagophila* population to *Schistosoma mansoni* after introducing the resistant Taim/RS strain of *B. tenagophila* into Herivelton Martins stream. *PLoS One*, **9**(6): e99573.
- Mascarenhas, A. & Castro, I., 2011. A rare case of haematuria. *Einstein* **9**(1Pt1): 81-83.
- Massara, C. L., Amaral, G. L., Caldeira R. L., Drummond, S. C., Enk, M. J., Carvalho, O. S., 2008. Esquistossomose em área de ecoturismo do estado de Minas Gerais, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, **24**(7): 1709-1712.
- Maurer, R. L., 2005. Caracterização morfológica e análise por microssatélites de DNA de isolados de campo do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, obtidos em Esteio, Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado em Zoologia. *Pontífica Universidade Católica, Rio Grande do Sul* 78 pp.

- Melman, S. D., Steinauer, M. L., Cunningham, C., Kubatko, L. S., Mwangi, I. N., Wynn, N. B., *et al.*, 2009. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; **3**(8):e504.
- Meurs, L., Mbow, M., Vereecken, K., Menten, J., Mboup, S. & Polman, K. 2012. Bladder morbidity and hepatic fibrosis in mixed *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni* Infections: a population-wide study in Northern Senegal. *PLoS Neglected Tropical Disease*, **6**: e1829.
- Meurs, L., Brienen, E., Mbow, M., Ochola, E. A., Mboup, S., Karanja, D. M. *et al.*, 2015. Is PCR the next reference standard for the diagnosis of *Schistosoma* in stool? A comparison with microscopy in Senegal and Kenya. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **9**(7):e0003959.
- Minchella, D. J., Lewis F. A., Sollenberg K. M., Williams J. A., 1994. Genetic diversity of *Schistosoma mansoni*: quantifying strain heterogeneity using a polymorphic DNA element. *Molecular Biochemical Parasitology* **68**(2): 307-313.
- MINPLAN, 2005. Estratégia de Combate à Pobreza: Exposição síntese de alguns itens selecionados (da vertente social) Luanda. Ministério do Planeamento, *Cadernos da População & Desenvolvimento*, **9**(1): 1 – 73.
- MINSa, 2000. Assessing Vitamin A and Iron Deficiency, Nutritional Aneamia among Children Aged 0 to 60 Month in the Republic of Angola. *Technical Report*. Ministério da Saúde, Programa Nacional de Nutrição, e UNICEF/Angola. Luanda.
- MINSa, 2001. Relatório do Programa Nacional do Controlo da Schistosomíase. Ministério da Saúde de Angola.
- MINSa, 2005. Inquérito nacional sobre a prevalência das helmintoses intestinais e das schistosomíases em crianças em idade escolar, Angola. MINSa/ MINED/ PAM/ OMS/ UNICEF, 23 pp.



MINSA, 2012. Boletim epidemiológico. Centro de processamento de dados epidemiológicos: Ministério da Saúde de Angola. Edição **12**: 10

Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Verkis, A., Petry, K. G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., Megraude, F., 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**(4): 995 – 998.

Mott, K. E., 1988. To wash or not wash: Nytrex filters and urinary schistosomiasis. *Parasitology Today*, **4**: 59 – 60.

Mullis, K. B. & Faloona, F. A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**: 335 – 350.

Mungomba, L. M. & Michelson, E. H., 1995. Urban schistosomiasis in Lusaka, Zambia: a preliminary study. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**: 199 - 203.

Norton, A. J., Charlotte M. Gower, Poppy H. L. Lamberton, Bonnie L. Webster, Nicholas J. S. Lwambo, Lynsey Blair, Alan Fenwick, Joanne P. Webster 2010. Genetic consequences of mass human chemotherapy for *Schistosoma mansoni*: Population structure Pre and Post Praziquantel treatment in Tanzania. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* **83**(4): 951- 957.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, **28**(12):E63.

Odiambo, G. O., Musuva R. M., Atuncha, V. O., Mutete E. T., Odiere, M. R., Onyango, R. O, Alaii, J. A, Mwinzi, P. N. 2014. Low levels of awareness despite high prevalence of schistosomiasis among communities in Nyalenda informal settlement, Kisumu city, western Kenya. *PLoS Neglected Tropical Disease*; **8**(4): e2784.

Oliveira, S. A., Barbosa A. A. Jr., Gomes D. C., Machado-Silva J. R. Barros A. F., Neves

R. H., Coutinho E. M. 2003. Morphometric study of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished infected mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98**(5): 623-627.

Oliveira, S. M., Albuquerque, M. C. P. A., Pitta, M. G. R., Malagueño, E., Santana, J. V., Lima, M. C. A., Pitta I. R., Galdino, S. L., 2004. A resposta de *Schistosoma mansoni* mantido in vitro frente a derivados imidazolidínicos. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, **23**(3): 343–348.

Oliveira A. L., Da Silva D., Zanotti-Magalhães E. M., Abdel-Hamid A. Z., Ribeiro-Paes, J. T., 2008. Schistosome/mollusc: genetic compatibility. *Genetics and Molecular Research: GMR*, **7**(2): 518 – 526

Oliveira L. M., Santos H. L., Gonçalves M. M., Barreto M. G., & Peralta J. M., 2010. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, **68**: 416 – 421.

Oliveira, L. M. A., 2007. Avaliação da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de fezes para o diagnóstico da infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Tese de mestrado. *Universidade Federal do Rio de Janeiro*. 92 Páginas

OMS, 1987. Atlas de la repartition mondiale des schistosomiasés. *Programme des maladies parasitaires*. Genève, Organisation Mondiale de la Santé.

OMS, 2002. TDR direção estratégica para a investigação: *Schistosomose*, Genebra 6 pp.

OMS, 2009. Grupo de Trabalho da OMS sobre esquistossomose urogenital e transmissão do HIV 2009. *Doenças Tropicais Negligenciadas*. Genève, Organisation Mondiale de la Santé.

Palmeira, C., Carvalho, A. G., Rodrigues, K., Couto, J. L. A., 2010. Prevalence of da *Schistosoma mansoni* infection in two municipalities of the State of Alagoas Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **43**(3): 313 – 317.

Pellegrino, J. & Coelho, PM., 1978. *Schistosoma mansoni*: Wandering capacity of worm couple. *Journal of Parasitology*, **64**: 181 – 182.

Petney TN, Andrews RH., 1998. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *International Journal of Parasitology* **28**: 377-93.

PNUD, 2005. Objectivos de Desenvolvimento do Milénio. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. *Relatório de Progresso*, 92 pp.

PNUD, 2010. Relatório de Desenvolvimento Humano 2010. A verdadeira Riqueza das Nações: *Vias para o Desenvolvimento Humano*. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. Edição do 20º Aniversário, 253 pp.

Polderman, A. M., Gryseels B., Gerald J. L., Mpamila K., Manshande J. P., 1984. Side effects of Praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* in Maniema, Zaire. *Transactions the Royal Society Tropical Medicine of Hygiene*, **78**(6): 752 – 754.

Pontes L. A. Dias-Neto E, Rabello A., 2002. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, **66**: 157 – 162.

Pontes, L. A., Oliveira, M. C., Katz, N., Dias-Neto, E., Rabello, A., 2003. Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with *Schistosoma mansoni*. *American Journal Tropical Medicine Hygiene* **68**: 652 – 656.

Primack, R., 2006. Essentials of Conservation Biology. *4th Edition*, Sinauer Associates.

- Quan, J. H., Choi, I. W., Ismail, H. A. H. A., Mohamed, A. S., Jeong, H. G., Lee, J. S., Hong, S. T., Yong, T. S., Cha, G. H., Lee, Y. H., 2015. Genetic Diversity of *Schistosoma haematobium* Eggs Isolated from Human Urine in Sudan. *Korean Journal Parasitology*, **53**(3):271-277.
- Rabello, A. L. T., 1997. Diagnosing schistosomiasis. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz*, **92**(5): 669-676.
- Rabello, A., Pontes, L. A., Dias-Neto, E., 2002. Recent advances in the diagnosis of *Schistosoma* infection: the detection of parasite DNA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* Volume **97** (Supplement I): 171-172.
- Rambau, P. F., Chalya, P. L., Jackson, K., 2013. Schistosomiasis and urinary bladder cancer in North Western Tanzania: a retrospective review of 185 patients. *Infectious Agents and Cancer*, **8**(1):19.
- Raso, G., N'Goran, E. K. Toty, A., Luginbuhl, A., Adjoua, C. A., Tian-Bi, N. T., Bogoch, I. I., Vounatsou, P., Tanner, M., Utzinger, J., 2004. Efficacy and side effects of Praziquantel against *Schistosoma mansoni* in a community of western Côte d'Ivoire. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **98**: 18–27.
- Rey, L., 1987. Estratégias métodos de controle da esquistossomose. *Cadernos de Saúde Pública*, **3**(1): 38-55.
- Rey, L., 2001. *Parasitologia; parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África* 3ª edição, Guanabara Koogan, 856 págs.
- Ribeiro, P. J., Aguiar, L. P. K., Toledo, C. F., Barros, S. M. O., Borges, D. R., 2004. Educational program in schistosomiasis: a model for a methodological approach. *Revista de Saúde Pública*, **38**(3): 415- 421.
- Richter, J., 2000. Evolution of schistosomiasis-induced pathology after therapy and

interruption of exposure to schistosomes: a review of ultrasonography studies. *Acta Tropica*, **77**: 111 – 131.

Rivas, M. A., Harbour, M. G., 2001. MaRTE OS: An Ada kernel for real-time embedded applications. In Proceedings of the 6<sup>th</sup> Ada-Europe International Conference on Reliable Software Technologies. *Lecture Notes In Computer Science*. Springer-Verlag, Berlin, **2043**: 305-316.

Rollinson, D., 1986. New approaches to schistosome identification. *Parasitology Today*, **2**(1): 24 – 25.

Rollinson, D., Kaukas A., Johnston D. A., Simpson A. J., Tanaka M, 1997. Some molecular insights into Schistosome evolution. *International Journal of Parasitology* **27**: 11- 28

Rollinson, D., Klinger, E. V., Mgeni, A. F., Khamis, I. S., Stothard, J. R., 2005. Urinary schistosomiasis on Zanzibar: application of two novel assays for the detection of excreted albumin and haemoglobin in urine. *Journal of Helminthology*, **79**:199- 206.

Ross, A. G., Barteley P. B., Sleigh A. C., Olds G. R., YueshengL, Williams G. M., 2002. Schistosomiasis. *Neglected Journal Medicine*, **346**(16): 1212-1220.

Ruffler, M., 1910. Note on the presence of *Bilharzia haematobium* in Egyptian mummies of the twentieth dynasty (1250- 1000 A.C.) *British Medical Journal*, 1: 16.

Sady, H., Al-Mekhlafi, H. M., Ngui, R., Atroosh, W. M., Al-Delaimy, A. K., Nasr, N. A., Dawaki, S., Abdulsalam, A. M., Ithoi, I. Lim, Y. A., Chua, K. H., Surin, J., 2015. Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* by Real-Time PCR with High Resolution Melting Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(7): 16085-103.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N., 1985.

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*, **230** (4732): 1350-1354.

Salzet, M., Capron, A., Stefano G. B., 2000. Molecular crosstalk in host-parasite relationships: Schistosome and leech-host interactions. *Parasitology Today*, **16**(12): 536-540.

Santos, J., Chaves, J., Videira, M., Botelho, M., Costa, J. M., Oliveira, J., Lúcio Lara, S., 2012. *Schistosoma haematobium* e carcinoma da bexiga. *Acta Urológica*, **4**: 13–17.

Santos, J., Chaves, J., Araújo, H., Vale, N., Costa, J. M., Brindley, P. J., Lopes, C., Naples, J., Shiff, C., Dupret, J., Santos, L. L., 2015. Comparison of findings using ultrasonography and cystoscopy in urogenital schistosomiasis in a public health centre in rural Angola. *South African Medical Journal* **105** (4): 312-315.

Satayathum SA, Muchiri EM, Ouma JH, Whalen CC, King CH., 2006. Factors affecting infection or reinfection with *Schistosoma haematobium* in coastal Kenya: survival analysis during a nine-year, school-based treatment program. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene*: **75**, 83–92.

Savioli, L., Hatz, C., Dixon, H., Kisumku, U., & Mott, K., 1990. Controlo f morbidity due to *Schistosoma haematobium* on Pemba Island: Egg excretion and haematuria as indicators of infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **43**: 289-295.

Savioli, L., Albonico, M., Engels, D., Montresor, A., 2004. Progress in the prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Parasitology International*; **53**(2):103-13.

Schwarz, N. G., Rakotozandrindrainy, R., Heriniaina, J. N., Randriamampionona, N., Hahn, A., Hogan, B., Frickmann, H., Dekker, D., Poppert, S., Razafindrabe, T., Rakotondrainiarivelo, J. P., May, J., Hagen, R. M., 2014. *Schistosoma mansoni* in

schoolchildren in a Madagascan highland school assessed by PCR and sedimentation microscopy and Bayesian estimation of sensitivities and specificities. *Acta Tropica*, **134**: 89-94.

Shalaby, I., Gherbawy, Y., Banaja, A., 2011. Genetic diversity among *Schistosoma mansoni* population in the Western Region of Saudi Arabia. *Tropical Biomedicine*, **28**(1): 90 – 101.

Shaw, G., & Friedman, J. F., 2011. “Iron deficiency anemia: focus on infectious diseases in lesser developed countries”. *Anemia*, ID 260380, 10 págs.

Shiff, C., Brouwer, K. C., Clow, L., 2000. *Schistosoma haematobium*: population genetics of *S. haematobium* by direct measurement of parasite diversity using RAPD-PCR. *Experimental Parasitology* **96**(1): 47- 51.

Siqueira, L. M., Gomes, L. I., Oliveira, E., Oliveira, E. R., Oliveira, Á. A., Enk, M. J., Carneiro, N. F., Rabello, A., Coelho, P. M., 2015. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **110**(2): 209-214.

Sire, C., Durand, P., Pointier, JP., Theron, A., 1999. Genetic diversity and recruitment pattern of *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* snail population: a field study using random-amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Parasitology*, **85**(3): 436-441.

Sneath, P. H., & Sokal, R. R., 1973. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. *Medical Research Council Microbial Systematics Unit*, University Leicester, San Francisco: W. H. Freeman, 573 pp.

Sousa, C. A. P., 1996. Esquistossomose haematóbica, distribuição da doença e organização social do espaço da Província do Bengo – Angola. Tese de Doutorado. *Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*. Ribeirão Preto 168 pp.

- Sousa-Figueiredo, J. C., Gamboa, D., Pedro, J. M., Fancony, C., Langa, A. J., Magalhães, R. J., Stothard, J. R. & Nery, S. V., 2012. Epidemiology of malária, schistosomiasis, geohelminths, anaemia and malnutrition in the context of a demographic surveillance system in northern Angola. *PLoS One*, **7** (4): e33189.
- Spear, R. C., Seto, E. Y., Carlton, E. J., Liang, S., Remais, J. V., Zhong, B., Qiu, D., 2011. The challenge of effective surveillance in moving from low transmission to elimination of schistosomiasis in China. *International Journal Parasitology*, **41**:1243–1247
- Standley, C. J., Dobson, A. P., & Stothard, R. J., 2012a. Out of animals and back again: Schistosomiasis as a Zoonosis in África. *InTech*, **209**: 223- 255.
- Standley, C. J., Mugisha, L., Dobson, A. P., & Stothard, R. J., 2012b. Zoonotic schistosomiasis in non-human primates: past, present and future activities at the human wildlife interface in África. *Journal of Helminthology*, **86**: 131–140.
- Steinauer, M. L., Hanelt, B. Mwangi, I. N., Main, G. M., Agola, L. E., Kinuthia, J. M. 2008. Introgressive hybridization of human and rodent schistosome parasites in western Kenya. *Molecular Ecology*, **17**(23):5062-5074.
- Stelma, F. F., Talla, I., Sow, S., Kongs, A., Niang, M., Polman, K., Deedler A. M, Gryseels, 1995. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni* epidemic. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*, **53**: 167-170.
- Stolher, R. A., Curtis, J., Minchella, D. J., 2004. A comparison of microsatellite polymorphism and heterozygosity among field and laboratory populations of *Schistosoma mansoni*. *International Journal of Parasitology*, **34**(5): 595- 601.
- Stothard, J. R., & Rollinson, D., 1996. An evaluation of random amplified polymorphic DNA for identification and phylogeny of freshwater snails of the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies*, **62**: 165 – 176. Summer, A.,



- Stauffer, W., Marouschek, S. R., Nevins, T. E., 2006. Haematuria in children due to Schistosomiasis in a nonendemic setting. *Clinic Paediatric (Phila)*, **45**(2): 177-81.
- Tanaka, H. & Tsuji, M., 1997. From discovery to eradication of schistosomiasis in Japan: 1847-1996. *International Journal of Parasitology*, **27**(12): 1465-1480.
- Taylor, MG., 1970. Hybridization experiments on five species of African schistosomes. *Journal of Helminthology* **44**: 253- 314.
- Taylor-Robinson DC, Maayan N, Soares-Weiser K, Donegan S, Garner P., 2015. Deworming drugs for soil-transmitted intestinal worms in children: effects on nutritional indicators, haemoglobin, and school performance. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 7. Art. No.: CD000371. DOI: 10.1002/14651858.CD000371.pub6.
- Tchuem Tchuente, L-A., Momo, S. C., Stothard, J. R., Rollinson, D., 2013. Efficacy of Praziquantel and reinfection patterns in single and mixed infection foci for intestinal and urogenital schistosomiasis in Cameroon. *Acta Tropica*, **128**: 275-283.
- Teodoro, T. M., Jannotti-Passos, L. K., Carvalho, O. dos. S., Grijalva, M. J., Baús, E. G., Caldeira, R. L., 2011. Hybridism between *Biomphalaria cousini* and *Biomphalaria amazonica* and its susceptibility to *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **106**(7): 851-855.
- Terer, C. C., Bustinduy, A. L., Magtanong, R. V., Muhoho, N., Mungai, P. L., 2013. Evaluation of the health-related quality of life of children in *Schistosoma haematobium*-endemic communities in Kenya: a cross-sectional study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **7** (3): e2106.
- Tohon, Z. B., Mainassara, H. B., Garba, A., Mahamane, A. E., Bosqué-Oliva, E., Ibrahim, M-L, *et al.*, 2008. Controlling schistosomiasis: significant decrease of anaemia prevalence one year after a single dose of praziquantel in Nigerian schoolchildren. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **2** (5): e241.

Tran, M. H., Pearson, M. S., Bethony, J., Smyth, D., Jones, M., Duke, M., 2006; Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. *Nature Medicine*, **12**, 835-840.

Tsai, M. H., Marx, K. A., Ismail, M. M., Tao, L., 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction assay for identification of *Schistosoma mansoni* strains sensitive or tolerant to anti-schistosomal drugs. *The Journal of Parasitology*, **86**(1):146–9.

Uchôa, E., 2000. The Control of Schistosomiasis in Brazil: An Ethno- Epidemiological study of Effectiveness of a Community Mobilization Program for Health Education. *Social Science & Medicine*, **51**:1529-1541.

UNICEF, 1998. Preventing iron deficiency in woman and children. *Technical consensus on Key issues*. Fundo das Nações Unidas para a Infância, New York.

UNPAF, 2015 – 2019. Partnership Framework Between the Government of Angola and the United Nations System (UNPAF) 2015–2016, 66 pp.

Utzinger, J., Becker, S. L., van Lieshout, L., van Dam, G. J., Knopp, S., 2015. New diagnostic tools in schistosomiasis. *Clinical Microbiology and Infection*, **21**(6): 529-42.

Valadares, T. E., Coelho, P. M. Z., Pellegrino, J., Sampaio, I. B. M., 1981. *Schistosoma mansoni*: aspectos da oviposição da cepa LE em camundongos infectados com um casal de vermes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **23**:6-11.

Van der Werf, M. J., De Vlas, S. J., Brooker, S., Looman, C. W. N., Nico, J. D., Nagelkerke, J., Dik, F., Habbema, Engels, D., 2003. Quantification of clinical morbidity associated with *Schistosome* infection in sub-Saharan Africa. *Acta Tropica*, **86**: 125-139.

- Vandenberg, N. & Oorschot, R. A., 2002. Extraction of human nuclear DNA from faeces samples using the QIAmp DNA Stool Mini Kit. *Journal Forensic Sciences*, **47**:993-995.
- Vinkeles Melchers N. V. S., van Dam, G. J., Shaproski, D., Kahama, A. I., Brienens, E. A. T., Vennervald, B. J., van Lieshout, L., 2014. Diagnostic Performance of *Schistosoma* Real-Time PCR in Urine Samples from Kenyan Children Infected with *Schistosoma haematobium*: Day-to-day Variation and Follow-up after Praziquantel Treatment. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**(4):e2807
- Voge, M., Price, Z., Bruckner, D. A., 1978. Changes in tegumental surface of *Schistosoma mekongi* Voge, Bruckner, and Bruce 1978, in the mammalian host. *Journal of Parasitology*, **64**(5):944-947.
- Wang, W., Wang, L., Liang, Y. S., 2012. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitology Research*; **111**(5):1871-7.
- Webster, M., Libranda-Ramirez, B. D. L., Aligui, G. D. L. Aligui, G. D., Olveda, R. M., Ouma, J. H., Kariuki, H. C., Kimani, G., Olds, G. R., Olds, G., R., Fulford, A. J. C., Butterwrth, A. E., Dunne, D. W., 1997. The influence of sex and age on antibody isotype responses to *Schistosoma japonicum* in human populations in Kenya and the Philippines. *Parasitology*, **144**:383-393.
- Webster, J. P., Gower, C.M. and Norton, A.J. 2008. Evolutionary concepts in predicting and evaluating the impact of mass chemotherapy schistosomiasis control programmes on parasites and their hosts. *Evolutionary applications* **1**:66-83.
- Webster, B. L., Rabone, M., Pennance, T., Emery, A. M., Allan, F., Gouvras, A., Knopp, S., Garba, A., Hamidou, A. A., Mohammed, K. A., Ame, S. M., Rollinson, D., and Webster, J. P., 2015. Development of novel multiplex microsatellite polymerase chain reactions to enable high-throughput population genetic studies of *Schistosoma haematobium*. *Parasites & Vectors*, **8**:519.

WHO, 1991. *Basic laboratory methods in medical parasitology*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WHO, 1998. Report of the WHO Informal Consultation on Monitoring of Drug Efficacy in the Control of Schistosomiasis and Intestinal Nematodes. World Health Organization, Geneva.

WHO, 2002. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. *Bulletin of the World Health Organization*, Geneva.

WHO, 2004. The global burden of disease: update. World Health Organization, Geneva.

WHO, 2005. Report of the Scientific Working Group meeting on Schistosomiasis.: 14-16. World Health Organization, Geneva.

WHO, 2006a. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthes. *Angola last updated*. Angola Country profile.

WHO, 2006b. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: World Health Organization, Geneva: pp 74.

WHO, 2008. Report of a WHO Informal Consultation. Elimination of schistosomiasis from low transmission areas. Salvador, Bahia, Brazil. World Health Organization:18–19.

WHO, 2010. Diseases. World Health Organization (*WHO/HTM/NTD/2010.1*). Geneva.

WHO, 2012. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation. World Health Organization, Geneva.

WHO, 2013a. Schistosomiasis: progress report 2001–2011, strategic plan 2012–2020, 81 pp. World Health Organization, Geneva.

WHO, 2013b. Country Cooperation Strategy at a glance WHO/CCO/13.01/Angola.

WHO, 2014. World Schistosomiasis Report, **89**: 21-28. World Health Organization, Geneva.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**:6531–6535.

Wilson, S., Vennervald, B.J., Dunne, D.W., 2011. Chronic Hepatosplenomegaly in African School Children: A Common but Neglected Morbidity Associated with Schistosomiasis and Malaria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **5**(8): e1149.

Yoshimura, M., Nakamura, S., Ogawa, H., 2005. TaqMan real-time PCR quantification: conventional and modified methods. *Methods in Molecular Medicine*; **108**:189-98.

Zacharias, F., de Carvalho, M. E., Gargioni, C., Teles, H. M., Ferreira, C. S., 2002. Schistosomiasis mansoni in Bananal State of São Paulo, Brazil. III Seroepidemiological studies in the Palha District. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Supplement 1)*: 19-22.

### **Sítios da internet**

<http://www.africa-turismo.com/mapas/angola>

<http://geo-geografias.blogspot.pt>

[http:// www.newdruginfo.com](http://www.newdruginfo.com)

<http://www.researchgate.net> acesso

<http://www.manole.com.br/clinica>

## **8. Anexos**

## Anexo 1- Procedimentos Éticos

### Anexo 1.1 – Pedido de autorização ao Comité de Ética de Angola (3ª via)

Lisboa, 25 de fevereiro de 2016

Ao Comité de Ética do Ministério da Saúde de Angola

Exmos Senhores

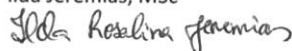
Ilda Rosalina Jeremias, Técnica Superior de Diagnóstico e Terapêutica do Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola (INSP), vem ressubmeter a V. Exas., para os devidos procedimentos, o protocolo de estudo intitulado ***“Schistosoma spp: genética do fenótipo de fármaco-resistência ao praziquantel”***, estudo integrando o INSP, em colaboração com a Direção Provincial de Saúde de Malange e o Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa (IHMT/UNL). O estudo tem como objectivo avaliar a existência de estirpes de *Schistosoma haematobium* e de *S. mansoni* potencialmente tolerantes/resistentes ao Praziquantel e fará parte da sua tese de doutoramento em Ciências Biomédicas, no âmbito do Programa de Doutoramento no IHMT/UNL que se encontra a frequentar.

O estudo será efetuado nos utentes do INSP, com diagnóstico presuntivo de schistosomose e em áreas endémicas na Província de Malange, na população rural exposta à infeção por *Schistosoma* spp., sendo a componente de investigação financiada parcialmente pela Fundação Calouste Gulbenkian e com Bolsa de estudo concedida pelo Instituto Nacional de Gestão de Bolsas de Angola.

Mais se informa que todos os procedimentos serão executados de acordo com os *Normas de bioética internacional* revistas na *Declaração universal sobre bioética e direitos humanos* (UNESCO, 2005).

Respeitosamente,

Ilda Jeremias, MSc



Anexos:

- 1- Protocolo do estudo *“Schistosoma spp: genética do fenótipo de fármaco-resistência ao praziquantel”*, estudo integrando o Instituto de Saúde Pública de Angola (ISPA)
- 2- Informação aos participantes
- 3- Declaração da Comissão Científica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

## Anexo 1.2 – Pedido de Consentimento Informado aos participantes

Instituto Nacional de Saúde Pública, Luanda, Angola  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical, UNL, Lisboa, Portugal

**Consentimento informado para um estudo sobre**  
“*Schistosoma* spp: genética do fenótipo de fármaco-resistência ao praziquantel”

### Informação aos participantes e responsáveis de educação das crianças que participam no estudo

#### **Informação sobre a schistosomose**

As pessoas podem ter schistosomose (bilharziose), uma doença provocada por parasitas que se transmitem através do contacto com coleções de água doce, como rios, lagoas, riachos. Estes parasitas podem causar “urina com sangue”, diarreia, dores de barriga e podem tornar as pessoas mais fracas (especialmente as crianças) e sujeitas a vir a ter outras doenças, tais como anemia e outras infecções. Se as pessoas tiverem esses parasitas e não forem tratadas, podem vir a ter problemas graves como cancro da bexiga, anemia. Nas crianças pode provocar atraso de crescimento e no desenvolvimento da aprendizagem.

#### **O que nós pretendemos fazer?**

A schistosomose é um problema sério de saúde nas nossas comunidades. A doença precisa de ser mais estudada de forma a avaliar se o medicamento usado no tratamento é eficaz para os parasitas que causam esta doença. Para isso precisamos de recolher amostras de sangue para avaliar a hemoglobina para saber se tem anemia, bem como recolher amostras de urina e de fezes para saber se tem schistosomose e outras parasitoses intestinais que também devem ser tratadas pelos profissionais de saúde.

#### **O que tem que fazer para você/ou a sua criança participar no estudo?**

Gostaríamos de lhe pedir que colhesse uma amostra de fezes e de urina e respondesse a perguntas sobre o modo de vida. Além disso, gostaríamos que nos autorizasse a recolher sangue para analisar e ver se tem anemia.

#### **Quais são os benefícios do estudo?**

O estudo ajudará a entender melhor como é que os parasitas que causam a schistosomose reagem ao medicamento. Para além disso, o estudo vai permitir tratar todos os participantes com exames positivos para schistosomose e também outras doenças parasitárias e a anemia, caso seja necessário, pelos profissionais de saúde. O tratamento é seguro e gratuito.

#### **Quais são os riscos de participar neste estudo?**

Não há nenhum risco relacionado com a colheita de amostras e a observação clínica. A colheita de fezes e de urina não causa dor. A avaliação da hemoglobina causa uma pequena dor no momento da colheita de sangue. As informações sobre os resultados das amostras só serão usadas para este estudo e serão mantidas secretas.

#### **O participante pode recusar participar no estudo?**

Sim, pode recusar. Se recusar, não haverá nenhuma consequência negativa.

#### **O que acontecerá depois do estudo?**

As amostras de sangue, fezes, o valor da hemoglobina e as informações sobre o modo de vida dos participantes serão estudados. Os resultados serão transmitidos às autoridades de saúde provincial. Se ainda tiver perguntas sobre este estudo, esteja à vontade para as fazer.

Muito obrigada pela sua participação!



Anexo 1.3 - Parecer do Comité de Ética de Angola



REPÚBLICA DE ANGOLA  
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
GABINETE DA DIRECTORA GERAL

SUA EXCELÊNCIA  
DR. LUÍS GOMES SAMBO  
SECRETÁRIO DE ESTADO DA SAÚDE

LUANDA

97/ GAB.DG/INSP/2016

Assunto: **Parecer do Comité de Ética**

Os nossos respeitosos Cumprimentos;

Conforme solicitação de Vossa Excelência remetemos em anexo o parecer do Comité de Ética do Ministério da Saúde sobre o projecto de doutoramento da **Dra. Ilda Rosalina Jeremias**

Com elevada consideração e estima

**Atenciosamente**

**GABINETE DA DIRECTORA GERAL DO INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA, EM LUANDA, AOS 29 DE FEVEREIRO/JUNHO DE 2016. –**

**A DIRECTORA GERAL**  
  
**Dr.ª Filomena Gomes da Silva**  
**“BIÓLOGA”**

Ministério da Saúde



816022900010004373876

Recibo

2016-02-29 13:18:54



REPÚBLICA DE ANGOLA  
MINISTÉRIO DA SAÚDE

### COMITÉ DE ÉTICA

**Assunto:** Parecer sobre Projecto de Estudo

#### Dados Identificadores do Projecto

- Título: "*Schistosoma mansoni*: genética do fenótipo de fármaco-resistência ao praziquantel, em Luanda e Malanje."
- Investigador: Ilda Rosalina Jeremias, Bióloga do Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola e discente do Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Portugal, inscrita no Curso de Doutoramento em Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia Médica.
- Orientadora: Prof.ª Doutora, Silvana Belo.
- Instituições: Instituto Nacional de Saúde Pública de Angola e Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Portugal.
- Objectivo do trabalho: Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biomédicas pela Universidade Nova de Lisboa de Portugal.

#### Justificativa e Objectivos

A demonstração por técnicas da biologia molecular, da variabilidade genética de *Schistosoma* spp e dos mecanismos de resistência ao praziquantel do *Schistosoma mansoni* vai contruir para a avaliação da estratégia actual de controlo da Schistosomose no país.


#### Metodologia e Questões Éticas

A proponente prevê a realização de um estudo prospectivo, analítico e não inclui os aspectos éticos e legais.

#### Conclusão

O Comité de Ética considera pertinente a realização deste estudo e recomenda a melhoria do protocolo, no que refere a definição de objectivos e a inclusão dos aspectos éticos relacionados com os eventuais benefícios da participação voluntária das pessoas convidadas, obtenção e manipulação das amostras biológicas humanas, importância da confidencialidade dos dados, da sua utilização e eventual publicação.

Luanda, aos 25 de Fevereiro de 2016

A Coordenadora  
  
 Dra. Filomena Gomes da Silva  
 "Bióloga"

## **Anexo 2 – Técnicas parasitológicas**

### **Anexo 2. 1 – Técnica de Kato-Katz**

É um método baseado no princípio de filtração, que consiste na eliminação de constituintes fecais mais volumosos e clarificando-os com o verde malaquita-glicerina, o que permite a contagem dos ovos de helmintas presentes (OMS, 1985; Belo, 2010b).

#### **Material (kit Ovo-FEC®)**

- Filtro de Nylon
- Espátula perfuradas
- Lâminas de vidro
- Tiras de celofane embebidas em solução de glicerina-verde malaquita
- Rolhas de catchu
- Papel absorvente
- Microscópio

#### **Método**

1. Colocar a placa perfurada sobre a lâmina de vidro formando um ângulo reto com a mesma.
2. Com a espátula retirar uma amostra de fezes, e comprimir com a extremidade da espátula, o que fará com que partes das fezes passem através da rede.
3. Com o auxílio da espátula, recolher as fezes que passaram pelo filtro e depositá-las no orifício da placa, perfurada, comprimindo-as até encher o orifício central.
4. Retirar o excesso de fezes, se necessário, passando a espátula sobre a placa.
5. Levantar a placa perfurada, inclinando ligeiramente um dos extremos, de modo que fique sobre a lâmina um cilindro de matéria fecal.
6. Colocar sobre o cilindro de matéria fecal a tira de celofane embebida em verde malaquita e comprimir com a rolha de catchu, de modo que as fezes se distribuam uniformemente na lâmina.
7. Manter a preparação à temperatura ambiente durante uma hora ou sob uma lâmina acesa durante 10–20 minutos, para clarificar a amostra de fezes.
8. Examinar ao microscópio, contando os ovos encontrados na preparação por espécie de helminta.
9. Com o auxílio da Tabela anexa, calcular o número de ovos/gramas de fezes (para cada espécie).

**Tabela 19 - Cálculo de número de ovos por gramas de fezes**

Nº de ovos encontrados na lâmina	Nº de ovos/ por grama	Nº de ovos encontrados na lâmina	Nº de Ovos/grama	No. de ovos encontrados na lamina	Nº de ovos /grama
1	24	36	864	71	1704
2	48	37	888	72	1728
3	72	38	912	73	1752
4	96	39	936	74	1776
5	120	40	960	75	1800
6	144	41	984	76	1824
7	168	42	1008	77	1848
8	192	43	1032	78	1872
9	216	44	1056	79	1896
10	240	45	1080	80	1920
11	264	46	1104	81	1944
12	288	47	1128	82	1968
13	312	48	1152	83	1992
14	336	49	1176	84	2016
15	360	50	1200	85	2040
16	384	51	1224	86	2064
17	408	52	1248	87	2088
18	432	53	1272	88	2112
19	456	54	1296	89	2136
20	480	55	1320	90	2160
21	504	56	1344	91	2184
22	528	57	1368	92	2208
23	552	58	1392	93	2232
24	576	59	1416	94	2256
25	600	60	1440	95	2280
26	624	61	1464	96	2304
27	648	62	1488	97	2328
28	672	63	1512	98	2352

29	698	64	1536	99	2376
30	720	65	1560	100	2400
31	744	66	1584	101	2424
32	768	67	1608	102	2448
33	792	68	1632	103	2472
34	816	69	1656	104	2496
35	840	70	1680	105	2520
	...		...		...

Para obter o número de ovos por grama de fezes, multiplica-se por 24 o número de ovos encontrado na preparação microscópica.

## **Anexo 2.2 – Técnica de Telemann-Lima**

Este método permite a pesquisa e identificação de helmintas nas fezes, consistindo numa emulsão, com duas fases distintas, uma aquosa e outra lipófila, separando as partículas fecais nomeadamente parasitas, resíduos alimentares e bactérias (Belo, 2010b).

### **Material**

- Água destilada
- Gaze ou rede metálica de malhas finas
- Centrifuga e respetivos tubos
- Éter;
- Rolhas de cortiça
- Copos cónicos de vidro
- Copos de vidro- Varetas de vidro
- Lâminas e lamelas de vidro
- Microscópio

### **Método**

1. Emulsionar em cerca de 20 cm<sup>3</sup> de água destilada o equivalente a uma colher de café de fezes (quando sólidas) ou a uma colher de sopa (quando líquidas).
2. Coar a emulsão obtida através de duas espessuras de gaze ou rede metálica de malhas finas.
3. Deitar o filtrado em tubos de centrifuga enchendo-o até um terço da sua altura e juntar um volume igual de uma mistura feita com água e éter em partes iguais.
4. Tapar o tubo de centrifuga com uma rolha e agitar bem
5. Centrifugar a 1500 rpm durante 2 minutos
6. Decantar o sobrenadante
7. Examinar o sedimento recorrendo a preparações microscópicas.

### Anexo 2.3 - Técnica de filtração da urina

**Objetivo:** Pesquisa e quantificação de ovos de *Schistosoma haematobium* na urina.

#### Material

- Seringas de plástico de 10 ml
- Suportes de plástico para filtros (13 mm ou 16 mm de diâmetro)
- Filtros de polycarbonato (Nucleopore®) ou de nylon (Nytrel®)
- Lâminas de microscópio
- - Pinças
- - Luvas
- - Microscópio

#### Método

1. Colocar o filtro no suporte.
2. Agitar ligeiramente o recipiente contendo a urina ou encher a seringa com a urina e vazá-la de novo para o recipiente 2-3 vezes.
3. Com a seringa, aspirar 10 ml da urina (se a quantidade da amostra for inferior a 10 ml, registrar o volume).
4. Adaptar à seringa o suporte contendo o filtro.
5. Mantendo a seringa na posição vertical e segurando no suporte, pressionar o êmbolo para que a urina seja expelida através do filtro.
6. Retirar o suporte da seringa, enchê-la com ar, colocar novamente o suporte e expelir o ar (esta operação tem por finalidade eliminar o excesso da urina e fixar melhor os ovos ao filtro).
7. Retirar de novo suporte a seringa e com ajuda da pinça, retirar o filtro Nucleopore®) e colocá-lo sobre a lâmina e em posição invertida.
8. Observar ao microscópio, contando os ovos presentes no filtro.
9. O resultado é expresso em nº de ovos/10 ml de urina.

**Nota:** Se o volume da urina analisada for inferior a 10 ml, a carga parasitária é determinada pela seguinte equação:

$$\text{Nº de ovos por 10 ml de urina} = \frac{\text{nº de ovos contados} \times 10}{X}$$

Onde X = volume de urina filtrada e examinada

**Anexo 2.4 – Ficha de inquérito****Pesquisa de *Schistosoma haematobium* e *S. mansoni* nas Províncias de Angola**

Data \_\_\_\_\_ Ficha No \_\_\_\_\_

Hospital/Centro \_\_\_\_\_

Localidade \_\_\_\_\_

**A. Dados pessoais**

Nome \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_

Naturalidade \_\_\_\_\_

Província \_\_\_\_\_

Residência/ Bairro \_\_\_\_\_ tempo de residência \_\_\_\_\_

Meio Urbano [ ] Suburbano [ ] Rural [ ] Outro [ ]

Escolaridade \_\_\_\_\_ Profissão \_\_\_\_\_

Atividade agrícola: Sim [ ] Não [ ]

Rendimento: &lt;20 \$USD [ ] 20-100 \$USD [ ] &gt;100 \$USD [ ]

**B. Condições de Habitação**

Água canalizada: Sim [ ] Não [ ] Fonte \_\_\_\_\_

Casa de banho: sim [ ] Não [ ] Interior [ ] Exterior [ ]

**C. Informação clínica**

Gravidez: 1-Primípara [ ] Tempo de gestação: semanas \_\_\_\_\_ Faz consultas regulares: sim [ ]

Gravidez: Multípara [ ] normal [ ] de risco [ ]

Alimentação (nº de refeições/ dia) \_\_\_\_\_

Sabe o que é a Schistosomose? Sim [ ] Não [ ]

Já teve *Schistosoma*? sim [ ] Tomou Praziquantel? Sim [ ] Não [ ]



**D. Resultados laboratoriais****1 – Sangue Hemograma****Valores de referência**

WBC	_____	_____
RBC	_____	_____
HGB	_____	_____
HCT	_____	_____
MCV	_____	_____
MCH	_____	_____
MCHC	_____	_____
PLT	_____	_____

**2. Exame de Urina: aspeto macroscópico** \_\_\_\_\_**Grau de hematúria:** 0 [ ] 1 [ ] 2 [ ] 3 [ ] 4 [ ]Nº de ovos de *S. haematobium* \_\_\_\_\_/10 ml**3. Exame de fezes**

Sangue nas fezes: sim [ ] não [ ]

*Schistosoma mansoni*: sim [ ] não [ ]

Helmintas	<i>A. lumbricoides</i>	[ ] nº ovos _____ ovos/g _____
	<i>T. trichiuria</i>	[ ] nº ovos _____ ovos/g _____
	Ancilostomídeos	[ ] nº ovos _____ ovos/g _____
	<i>E. vermicularis</i>	[ ] nº ovos _____ ovos/g _____
	<i>S. mansoni</i>	[ ] nº ovos _____ ovos/g _____
	Taenidae	[ ] nº ovos _____ ovos/g _____
	<i>Hymenolepis</i> sp	[ ] nº ovos _____ ovos/g _____
	<i>S. stercoralis</i>	[ ] larvas _____

**Observações**


---



---



---



---

### **Anexo 3 - Técnicas moleculares**

#### **Anexo 3.1 - Extração de DNA de fezes e urina pelo método de CTAB (tampão brometo de hexadeciltrimetilamônio), descrito por Stothard *et al*, (1998) com ligeiras modificações.**

1. De acordo com as recomendações do fabricante, coloca-se inicialmente 600µl de tampão CTAB (2M tris acetato 0,05 EDTA, pH=8,3) previamente aquecido na estufa 56,5°C durante 10 minutos, num tubo de eppendorf.
2. Adicionar 10µl de proteinase K com o objetivo de desproteínização da amostra.
3. Coloca-se uma alíquota de 300µl de amostra nomeadamente, o sedimento contendo ovos de *S. haematobium* (urina) ou sedimento contendo ovos de *S. mansoni* (fezes) em tubo de eppendorf estéril, previamente preparada.
4. Homogeneizar muito bem.
5. Em seguida a mistura é incubada em estufa a 55°C, durante 1h e 30 minutos agitando de 15 em 15 minutos.
6. Posteriormente adicionou-se á mistura 600µl de Clorofórmio: Isoamyl 24:1 previamente aquecido a 56,5°C na estufa durante 10 minutos
7. Agita-se a mistura por inversão durante 2 minutos.
8. Seguidamente submete-se á centrifugação rápida separando-se a parte orgânica da fase aquosa.
9. Coloca-se 800µl de Etanol gelado em tubos novos de eppendorf.
10. Transfere-se o sobrenadante para os tubos novos contendo etanol gelado e descartado o tubo contendo o filtrado da centrifugação.
11. Amostra é submetida a centrifugação 13000 rpm durante 20 minutos. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante.
12. Seguidamente procede-se a lavagem do pellet adicionando 500µl de etanol a 70%.
13. Centrifuga-se novamente a 13000 rpm durante 15 minutos.
14. Descarta-se o sobrenadante total e escorrer.
15. Após esta etapa a amostra é deixada em repouso por 5 minutos á temperatura ambiente para melhor concentração do DNA. Secar o pellet a 55°C no máximo 15 minutos e o DNA é ressuscitado em 50µl de água destilada e conservado até sua utilização.

**Anexo 3.2 - Extração de DNA de fezes e urina pelo método de Trizol com ligeiras modificações.**

**Extração e Precipitação do DNA**

1. Retirar certa quantidade de amostra e colocar em tubos estéreis
2. Macerar o material
3. Adicionar 300 µl de etanol 100%
4. Agitar por inversão
5. Deixar a amostra repousar a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos
6. Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C
7. Retirar o sobrenadante
8. Lavar com 1mL de Citrato Sódio
9. Deixar repousar por 30 minutos a temperatura ambiente
10. Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C
11. Repetir os passos 6, 7, 8 e 9
12. Descartar o sobrenadante
13. Lavar com 2 ml de etanol 70%
14. Deixar repousar 10 a 20 minutos a temperatura ambiente
15. Centrifugar a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C
16. Retirar o sobrenadante
17. Colocar o tubo aberto a 60°C no máximo 15min
18. Adicionar 50-100µl de tampão TE (pH 7) ou água ultrapura.